

Untersuchungen zur Modulation der Somatischen Hypermuation durch Transkriptionsfaktoren

Dissertation
der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

30. Oktober 2008

vorgelegt von
Hanna Scheller
aus Bremen

angefertigt am
Helmholtz Zentrum München
Deutsches Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt

1. Gutachter: Prof. Dr. Dirk Eick
2. Gutachter: Prof. Dr. Elisabeth Weiss
Prüfung: 3.7.2009

For Tony

Teile dieser Arbeit werden wie folgt veröffentlicht:

c-Myc overexpression promotes a germinal center -like program in Burkitt's lymphoma

Hanna Scheller, Stephanie Tobollik, André Kutzera, Martina Eder, Torsten Thiel, Ines Pfeil
and Berit Jungnickel

(Manuskript in Vorbereitung)

Die Arbeit wurde auf folgenden wissenschaftlichen Kongressen präsentiert:

Summer School "Molecular Interactions during Infection" in Quedlinburg (2006) (Poster)

Interact PhD Symposium in Martinsried (2007) (Poster)

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	V
Abkürzungen	VI
1 Zusammenfassung	1
2 Einleitung	2
2.1 B-Zellentwicklung	4
2.2 Die Keimzentrumsreaktion	5
2.3 Die Somatische Hypermutation	7
2.4 Regulation der somatischen Hypermutation	10
2.5 Mechanismen der B-Zell-Lymphomentstehung.....	12
2.6 Transkriptionsfaktoren im Keimzentrum	15
2.7 Modellsysteme zur Untersuchung der somatischen Hypermutation	21
2.8 Zielsetzung	23
3 Ergebnisse	25
3.1 Charakterisierung der Hypermutationsaktivität von B-Zellen	25
3.1.1 Darstellung des verwendeten Hypermutationsassays und dessen Verbesserung	25
3.1.2 Charakterisierung der SHM-Aktivität verschiedener Zelllinien	27
3.1.3 Variabilität in isogenen Zellsystemen und für unabhängige Assays in derselben Zelllinie	29
3.1.4 Enhancereffekte in ausgewählten Zelllinien	30
3.2 Vergleichende Analyse hypermutierender und nicht-hypermutierender B-Zelllinien.....	31
3.2.1 Vergleich auf phänotypischer Ebene.....	31
3.2.2 Vergleich auf Ebene der RNA-Expression	33
3.2.3 Vergleich auf Ebene der Proteinexpression	35
3.3 Etablierung der Überexpression von Keimzentrumstranskriptionsfaktoren ..	37
3.3.1 Klonierung der Überexpressionsvektoren.....	37
3.3.2 Test der Vektoren in verschiedenen Zelllinien	38
3.3.3 Etablierung von überexprimierenden Einzelzellklonen	38

3.3.4	Charakterisierung der Einzelzellklone	39
3.4	Auswirkungen der Überexpression der Transkriptionsfaktoren auf AID	42
3.4.1	Überexpression der Transkriptionsfaktoren in verschiedenen Zelllinien	42
3.4.2	Überexpression der Transkriptionsfaktoren in titrierten Induktionen.....	45
3.4.3	Untersuchung der Überexpression mittels MACS-Strategie	46
3.4.4	Induktion von Protein durch Überexpression in Einzelzellklonen.....	47
3.4.5	Einfluss der Transkriptionsfaktor-Überexpression auf CD77.....	49
3.5	Auswirkungen der Überexpression auf die SHM.....	50
3.5.1	Hypermutationsassays in Batchkulturen verschiedener Zelllinien	50
3.5.2	Hypermutationsassays in Einzelzellklonen der Raji-Zelllinie	51
3.5.3	Verlauf der Überexpression innerhalb der Hypermutationsassay.....	54
3.6	Auswirkungen der Herunterregulation der Transkriptionsfaktoren	58
3.6.1	Klonierung der shRNA-Vektoren	58
3.6.2	RNA Interferenz für bcl6 und c-myc	59
3.6.3	RNAi für alle untersuchten Transkriptionsfaktoren.....	61
3.7	C-Myc und Faktoren des Keimzentrumsprogramms.....	62
3.7.1	C-Myc und der Keimzentrumsphänotyp	62
3.7.2	C-Myc beeinflusst Transkriptionsfaktoren in der Zelllinie P493.6.....	64
3.7.3	C-Myc beeinflusst Transkriptionsfaktoren in BL-Zelllinien	67
3.7.4	C-Myc beeinflusst die somatische Hypermutationaktivität	69
4	Diskussion.....	71
4.1	Charakterisierung der Hypermutationsaktivität.....	72
4.2	Korrelation der Expression von Transkriptionsfaktoren mit der Hypermutationsaktivität verschiedener Zelllinien	75
4.3	Manipulation von Transkriptionsfaktoren in hypermutierenden Zelllinien....	77
4.3.1	Experimentelle Ansätze zur Manipulation.....	77
4.3.2	Überexpression der Transkriptionsfaktoren	80
4.3.3	Herunterregulation der Transkriptionsfaktoren.....	82
4.3.3.1	RNAi in hypermutierenden Zelllinien.....	82
4.3.3.2	Konditionale Zellsysteme und Inhibitoren.....	84
4.4	Ausblick.....	85
5	Material	87
5.1	Chemikalien und Verbrauchsmaterial.....	87
5.2	Geräte	87
5.3	Datenverarbeitung	87

5.4	Bakterien	87
5.5	Verwendete Kits	88
5.6	Enzyme	88
5.7	Größenstandard	88
5.8	Antikörper.....	89
5.9	Oligonukleotide.....	89
5.10	Plasmide	91
5.11	Zelllinien.....	92
6	Methoden	93
6.1	Zellbiologische Techniken	93
6.1.1	Auftauen und Einfrieren von Zellen.....	93
6.1.2	Zellkultur	93
6.1.3	Schaltung der P493.6 Zelllinie	94
6.1.4	Generieren von Einzelzellklonen	94
6.1.5	Transfektion	94
6.1.6	FACS (Fluorescence activated cell sorting).....	95
6.1.7	Bestimmung der Hypermutationsaktivität	95
6.1.8	MACS-Aufreinigung.....	96
6.2	Techniken der DNA-Analyse.....	98
6.2.1	DNA-Isolierung und -Quantifizierung	98
6.2.2	Klonierung: Allgemeine Vorgehensweise	98
6.2.3	Klonierung der Überexpressionsvektoren.....	99
6.2.4	Klonierung der Hypermutationsreporter	101
6.2.5	Klonierung der shRNA-Vektoren	101
6.3	Proteinbiochemische Analysen.....	102
6.4	Techniken der RNA-Analyse.....	102
6.4.1	RNA-Reinigung	102
6.4.2	ReverseTranskription-PCR	103
6.4.3	Quantitative RT-PCR	103
7	Literaturverzeichnis.....	105
	Danksagung.....	124
	Ehrenwörtliche Erklärung.....	125
	Erklärung.....	126
	Lebenslauf	127

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Humaner Immunglobulingenlocus der schweren Kette (nach Di Noia und Neuberger, 2007).....	3
Abbildung 2: Frühe B-Zellentwicklung im Knochenmark und spätere Differenzierung im Keimzentrum nach Antigenkontakt	6
Abbildung 3: Modell der Somatischen Hypermutation (nach di Noia und Neuberger, 2007)	9
Abbildung 4: Transkriptionsfaktorbindestellen der AID- und Ig-Loci	15
Abbildung 5: Reportersystem zur Bestimmung der Hypermutationsaktivität	25
Abbildung 6: Test des verbesserten Hypermutationsreporters.....	26
Abbildung 7: Vergleich der Hypermutationsaktivität verschiedener Zelllinien.....	28
Abbildung 8: Hypermutationsaktivität in isogenen Zelllinien und Einzelzellklonen.....	30
Abbildung 9: Enhancereffekte für ausgewählte Zelllinien.....	31
Abbildung 10: CD77/38 FACS-Färbung zur Ermittlung des Zentroblastenphänotyps.....	32
Abbildung 11: mRNA-Expressionsmengen von Keimzentrumsfaktoren im Zelllinienset	34
Abbildung 12: Proteinmengen für AID und die Transkriptionsfaktoren im Zelllinienset	36
Abbildung 13: Ausgangsvektor für die Überexpression der Transkriptionsfaktoren.....	37
Abbildung 14: Test der Überexpressionsvektoren für Bcl6, c-Myc, E12 und Pax5	38
Abbildung 15: Charakterisierung der verwendeten Raji-Überexpressionsklone.....	40
Abbildung 16: Induktion von Transkriptionsfaktoren in Raji-Einzelzellklonen:.....	41
Abbildung 17: AID-Überexpression in Raji-Einzelzellklonen	42
Abbildung 18: Überexpression der Transkriptionsfaktoren in Batchkulturen verschiedener Zelllinien	43
Abbildung 19: C-Myc-Überexpression nach zwei bis fünf Tagen Induktion mit Doxycyclin.....	46
Abbildung 20: Zweistufige MACS-Reinigung und Anwendung auf überexprimierende Einzelzellklone	48
Abbildung 21: CD77-Expression bei Überexpression der Transkriptionsfaktoren in Einzelzellklonen	50
Abbildung 22: Somatische Hypermutation in Bcl6- und c-Myc-überexprimierenden Einzelzellklonen	52
Abbildung 23: Somatische Hypermutation in E2A- und Pax5-überexprimierenden Einzelzellklonen.....	53
Abbildung 24: Hypermutationsassay bei Überexpression von AID in Einzelzellklonen.....	54
Abbildung 25 Überexpression der Transkriptionsfaktoren während des Hypermutationsassays	56
Abbildung 26: Überexpression in den ngfr-positiven Zellen der Hypermutationsassays	57
Abbildung 27: AID-Überexpression während des Hypermutationsassays	58
Abbildung 28: Vektor und Funktionsweise der Herunterregulation über siRNA	59
Abbildung 29: Herunterregulationseffizienz von siRNA gegen bcl6 und c-myc und Effekte auf AID.....	60
Abbildung 30: RNA-Interferenz für bcl6, c-myc, E2A und pax5	61
Abbildung 31: Schematische Darstellung der Etablierung einer konditionalen Zelllinie	63
Abbildung 32: Einfluss von c-Myc auf den Zentroblastenmarker CD77.....	64
Abbildung 33: Transkriptionelle Beeinflussung der mRNA-Level von AID und bcl6 durch c-Myc in P493.6.....	66
Abbildung 34: Langzeiteffekte von c-Myc auf E2A und AID in P493.6.....	67
Abbildung 35: Einfluss von c-Myc auf Transkriptionsfaktoren in BL-Zelllinien.....	68
Abbildung 36: Einfluss von c-Myc auf die somatische Hypermutation in der BL-Zelllinie Raji	70
Abbildung 37 Proteingrößenstandard.....	88
Abbildung 38: Prinzip der MACS-Aufreinigung.....	96
Abbildung 39: Design der Oligonukleotide für shRNA-Vektoren (nach T.Thiel, Diplomarbeit).....	101

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über die verwendeten Zelllinien sowie Angaben zum Ursprung und EBV Status	27
Tabelle 2: Zusammenfassung der Generierung von Überexpressions-Einzelzellklonen	39
Tabelle 3: Effizienz der MACS-Aufreinigung für die Überexpression in Batchkulturen	44
Tabelle 4: Ergebnisse der Ngfr-Färbung innerhalb der somatischen Hypermutationsassays.....	55
Tabelle 5: In der Western Blot-Analytik verwendete Antikörper	89
Tabelle 6: In der FACS-Analytik und MACS-Separation verwendete Antikörper.....	89
Tabelle 7: Primer zur Amplifikation der cDNA für die Klonierung von Überexpressionvektoren	89
Tabelle 8: DNA-Oligonukleotide für (quantitative) RT-PCR-Reaktionen	90
Tabelle 9: Oligonukleotide für die Klonierung von shRNA-Vektoren	90
Tabelle 10: Verwendete Plasmide.....	91
Tabelle 11: Verwendete Zelllinien.....	92
Tabelle 12: Transfektionsparameter.....	95

Abkürzungen

A	Adenin
Abb.	Abbildung
AID	Aktivierungsinduzierte Cytidineaminase
Amp	Ampizillinresistenzgen
AP-Stelle	Apurinische/Apyrimidinische Stelle
APOBEC1	Apolipoprotein B mRNA editierendes Enzym, katalytisches Polypeptid
BCR	‚ <i>B cell receptor</i> ‘, B-Zell-Rezeptor
BER	‚ <i>base excision repair</i> ‘, Basenexzisionsreparatur
bp	Basenpaar (e)
BL	Burkitt-Lymphom
BSA	‚ <i>bovine serum albumine</i> ‘, Rinderserum Albumin
C	Cytosin
cDNA	copy-DNA
CLP	<i>Common Lymphoid Progenitor</i>
CSR	‚ <i>class switch recombination</i> ‘, Klassenwechselrekombination
C-Region	‚ <i>constant region</i> ‘, konstante Region
D	Adenin, Guanin oder Thymin
DLCL	‚diffuse large B cell lymphoma‘, Diffuses großzelliges Lymphom
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	‚ <i>deoxyribonucleic acid</i> ‘, Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
Dox	Doxycyclin
dsDNA	doppelsträngige DNA
D-Segment	‚ <i>diversity</i> ‘-Segment des V-Gens
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	‚ <i>Enhanced chemiluminescence</i> ‘
EBNA	Epstein-Barr virales Kern Antigen („ <i>EBV-nuclear-antigen</i> “)
EBV	Epstein-Barr-Virus
E μ	IgH-Enhancer
Ei	‚ <i>J-C intronic enhancer</i> ‘
ER	‚ <i>estrogen receptor</i> ‘, Östrogenrezeptor
et al.	‚ <i>et alii</i> ‘, und andere
F	Farad, physikalische Einheit der Kapazität
FACS	‚ <i>fluorescence activated cell sorting</i> ‘, Fluoreszenzgekoppelte Zellanalyse
FDC	follikuläre dendritische Zelle
FKS	fötales Kälberserum
FL	Follikuläres Lymphom
g	Gramm
G	Guanin
GFP	‚ <i>green fluorescent protein</i> ‘
h	Stunde
HA	Hämagglutinin
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinethan-Sulfonsäure
HL	Hodgkin Lymphom
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase
HRP	‚ <i>horseradish peroxidase</i> ‘ Meerrettich Peroxidase
Ig	Immunglobulin
IgH	Immunglobulin der schweren Kette
IgL	Immunglobulin der leichten Kette

IRES	Interne Ribosomen-Eintrittsstelle
J-Segment	„ <i>joining</i> “-Segment des V-Gens
LCL	„ <i>lymphoblastoid cell line</i> “, Lymphoblastoide Zelllinie
l	Liter
LMP1/2A	„ <i>latent membrane proteins 1/2A</i> “
M	molar
MACS	„ <i>Magnetic associated cell sorting</i> “ Zellsortierung nach magnetischer Markierung
MAR	„ <i>matrix attachment region</i> “
min	Minute
μ-Kette	schwere Kette des Immunglobulins M
MMR	„ <i>mismatch repair</i> “, Fehlpaarungsreparatur
mRNA	Boten-RNA („ <i>messengerRNA</i> “)
NF-κB	„ <i>nuclear factor-κB</i> “ Kernfaktor-κB
PBS	„ <i>phosphate buffered saline</i> “, Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCNA	„ <i>proliferation cell nuclear antigen</i> “
PCR	„ <i>polymerase chain reaction</i> “, Polymerasekettenreaktion
Primer	Startoligonukleotid für die DNA-Polymerase
PVDF	Polyvinylidenfluorid
R	Purinbasen: Adenin oder Guanin
RNA	„ <i>ribonucleic acid</i> “, Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RNase	Ribonuklease
RT-PCR	reverse Transkription mit Polymerasekettenreaktion
SDS	„ <i>sodium dodecyl sulphate</i> “, Natriumdodecylsulfat
s	Sekunde
SHM	Somatische Hypermutation
S-Region	Schalter-Region
STAT	Signaltransduktions-aktivierter Transkriptionsfaktor
T	Thymin
Tet	Tetracyclin
TdT	terminale Desoxynukleotidyltransferase
TF	Transkriptionsfaktor
TLS	Translasionssynthese
U	Unit (Enzymaktivitätseinheit)
UNG	Uracil-Glykosylase
U	Uracil
V	Volt
V-Gen	Gen der variablen Region
V-Segment	„ <i>variable</i> “-Segment des V-Gens
W	Adenin oder Thymin
Y	Pyrimidinbasen: Thymin oder Cytosin
z. B.	zum Beispiel

1 Zusammenfassung

Die Somatische Hypermutation (SHM) in B-Lymphozyten des Keimzentrums ist ein zentraler Prozess der Affinitätsreifung von Antikörpern innerhalb der adaptiven Immunantwort. Sie ist einer der wenigen Vorgänge, der physiologisch und gezielt in die DNA von Zellen eingreift. Durch die Aktivierungs-induzierte Cytidin-Deaminase (AID) werden DNA-Läsionen eingeführt, die durch fehlerhafte Reparatur ausgeweitet und fixiert werden können. Dieser Mechanismus ist nötig um wirksame Antikörper gegen die Vielzahl der sich ständig verändernden Pathogene zu entwickeln. Die SHM ist jedoch auch mit Gefahren für den Organismus verbunden. So entstammt ein großer Teil der B-Zell-Lymphome dem Keimzentrum und es finden sich in verschiedenen nicht-Immunglobulin (Ig) -Genen aberrante Mutationen, die einen Beitrag zu onkogenen Transformationen leisten können. Die Regulation der SHM-Aktivität ist deswegen von großer Wichtigkeit und Transkriptionsfaktoren (TF), die im Keimzentrum differentiell reguliert werden, könnten ein Schlüssel für das Verständnis dieser Regulation sein.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde deshalb der Einfluss der vier Transkriptionsfaktoren Bcl6, c-Myc, E2A und Pax5 auf die SHM-Aktivität untersucht. Dazu wurde in verschiedenen B-Zelllinien mit einem Transgen-basierten Hypermutationsassay die SHM-Aktivität ermittelt und mögliche Korrelationen dieser Aktivität mit der Expression der TF untersucht. Anschließend wurde mittels Überexpressionsvektoren und RNA-Interferenz-Technik die Expression der Transkriptionsfaktoren manipuliert und die Auswirkungen dieser Manipulation auf AID und die SHM-Aktivität ermittelt.

Es zeigte sich eine Korrelation der SHM-Aktivität mit der Expression des Zentroblastenmarkers CD77, nicht jedoch mit einem der untersuchten Transkriptionsfaktoren. In Überexpressionsexperimenten konnte ein positiver Effekt von Bcl6 und eventuell von c-Myc auf die AID-Expression gezeigt werden. Hypermutationsassays zeigten bei Überexpression der TF keine Unterschiede der SHM-Aktivität. RNA-Interferenz-Versuche bestätigten dagegen den positiven Effekt von Bcl6 auf die AID-Expression und zeigten auch Einflüsse der anderen Faktoren, unter anderem von c-Myc.

In einem konditionalen Zellsystem zeigte sich neben einer transienten Induktion von *bcl6*- und *AID*-RNA-Expression auch eine langfristige Förderung der Proteinexpression der wichtigen Keimzentrumsfaktoren Bcl6, E2A und AID sowie der CD77-Expression durch c-Myc. Die Beeinflussung dieser Parameter konnten auch in Burkitt-Lymphom-(BL)Zelllinien bestätigt werden, die eine charakteristische deregulierte c-Myc-Expression aufweisen.

Damit konnten in dieser Arbeit Hinweise auf eine positive Regulation von AID durch Bcl6 und auf eine neue Rolle von c-Myc bei der Förderung eines Keimzentrumsprogramms in der Pathogenese des Burkitt-Lymphoms gewonnen werden.

2 Einleitung

Bereits einfache Mehrzeller benötigen Schutz gegen die Infektion durch andere Organismen. Deshalb finden sich schon bei primitiven Mehrzellern wie Schwämmen Mechanismen zur Unterscheidung von Selbst und Fremd sowie eine Abwehrreaktion gegen Fremdmoleküle (Wiens et al., 2007). Diese Form der Verteidigung war zunächst der einzige Weg Infektionen zu bekämpfen und führte zur Entwicklung einer Vielzahl von Rezeptoren zur Identifikation von sogenannten „Pathogen-assoziierten molekularen Mustern“, die noch heute unter anderem als TLRs (*toll-like-receptors*) Teil des angeborenen Immunsystems sind (Janeway und Medzhitov, 2002). Vor etwa 500 Millionen Jahren entstand innerhalb der ersten Wirbeltiere jedoch zusätzlich das Prinzip der adaptiven Immunantwort, das auf der somatischen Veränderung von Genen, die für Rezeptoren auf spezialisierten Immunzellen kodieren, durch Rekombination beruht (Pancer und Cooper, 2006). Auf die Rekombination können weitere Diversifizierungsschritte folgen, um die Affinität der Rezeptoren weiter zu verändern oder die Effektorfunktion zu modulieren (Cannon et al., 2004).

In Säugetieren unterscheidet man nach dem Ort ihrer Differenzierung zwei Hauptkomponenten des adaptiven Immunsystems: T-Zellen aus dem Thymus und B-Zellen aus dem Knochenmark. Während T-Zellen je nach Typ sehr verschiedene Aufgaben haben, von der Stimulation anderer Zellen, der Identifikation von Fremd- oder entarteten Eigenzellen bis zum Töten von Pathogenen, ist die Hauptaufgabe von B-Zellen die Produktion von Antikörpern. Beide Zelltypen durchlaufen eine Rekombination der Gene ihrer Antigen-detektierenden Rezeptoren, des B- bzw T-Zellrezeptors. Der B-Zell-Rezeptor (BCR) besteht aus jeweils zwei identischen schweren und leichten Ketten, deren Gene durch kombinatorische Zusammensetzung aus einem V (*variable*)-, D (*diversity*, nur im Gen der schweren Kette)-, J (*joining*)- und C (*constant*)-Element entstehen. Für die schwere Kette existiert nur ein Gen, das IgH-Gen (*immunoglobulin heavy chain*) (siehe Abbildung 1), während es zwei alternative Gene für die leichte Kette gibt, die kappa- κ und lambda- λ leichte Kette. Die Verknüpfung der V-, (D), und J-Segmente durch einen spezialisierten Prozess führt zu einer junktionalen Diversität der entstehenden variablen Region zusätzlich zur kombinatorischen Diversität. Die V(D)J-Rekombination generiert so bereits etwa 10^5 bis 10^6 verschiedene variable Regionen für Rezeptoren zur Antigen-detektion (Di Noia und Neuberger, 2007). Dieser Prozess läuft bereits in frühen B-Zellen ab und sein schrittweiser Verlauf markiert die Stadien der B-Zellentwicklung. Das konstante C-Element, das entscheidend für die Effektorfunktion ist, kann erst wesentlich später, nach Antigenkontakt der Zellen, innerhalb eines als Klassenwechselrekombination (CSR, *class switch*

recombination) bezeichneten Prozesses ausgetauscht werden. Dabei werden DNA-Strangbrüche zwischen spezialisierten Schalter-Regionen verbunden und der dazwischen liegende Abschnitt deletiert.

Die gelöste Form des B-Zell-Rezeptors wird als Antikörper bezeichnet. Da seiner Affinität zum entsprechenden Antigen eine besonders wichtige Rolle bei einer Immunantwort zukommt, wird diese durch zwei verschiedene Prozesse modifiziert, die Genkonversion und die somatische Hypermutation, die in verschiedenen Organismen unterschiedlich stark zum Einsatz kommen. Im Menschen spielt die Genkonversion, bei der homologe Sequenzen von Pseudogenen zur Differenzierung verwendet werden, praktisch keine Rolle. Stattdessen verändern die B-Zellen ihren Rezeptor durch die somatische Hypermutation, das Einführen von Mutationen in den variablen Bereich des Gens, der für die Antigenerkennung zuständig ist.

Alle vier angesprochenen Prozesse, V(D)J-Rekombination, Klassenwechselrekombination, Genkonversion und somatische Hypermutation, verändern die genetische Information unwiederbringlich und machen eine stringente Kontrolle und Regulation erforderlich, die zumindest teilweise durch die Aktivität unterschiedlicher Transkriptionsfaktoren im Laufe der B-Zellentwicklung gesteuert wird.

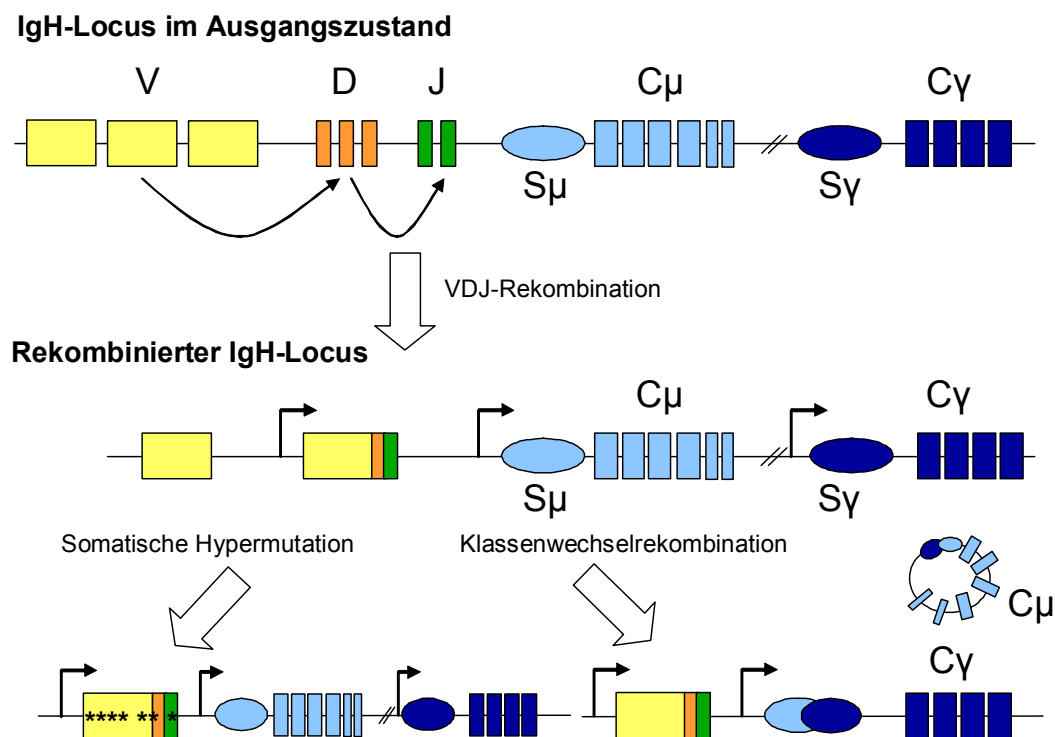


Abbildung 1: Humaner Immunglobulinlocus der schweren Kette (nach Di Noia und Neuberger, 2007)

Im Knochenmark findet die VDJ-Rekombination statt. In der späteren B-Zellentwicklung, im Keimzentrum, kommt es zu AID-abhängigen genetischen Veränderungen des Ig-Locus, der Somatischen Hypermutation und der Klassenwechselrekombination. V: Exons der variablen Segmente; D: Exons der Diversitäts-Segmente; J: Exons der Verbindungs-Segmente; C: Exons der konstanten Segmente; S: Schalter-Region; μ und γ : Exons für die Isotypen IgM und IgG; ***: Bereich, in dem Mutationen durch SHM eingeführt werden.

2.1 B-Zellentwicklung

B- und T-Zellen entwickeln sich aus gemeinsamen, aus dem Knochenmark stammenden Vorläuferzellen, den *common lymphoid progenitor* (CLP)-Zellen, aber in unterschiedlichen Organen. Beide benötigen zu ihrer Differenzierung Wachstumsfaktoren, welche von Stromazellen im Knochenmark beziehungsweise dem Thymus produziert werden und in den CLPs die Expression erster Zelllinien-spezifischer Gene induzieren. Zusätzlich exprimieren Stromazellen im Thymus einen Notch-Liganden, der ein Signal in den Zellen auslöst, die daraufhin zu T-Zellen differenzieren. Stromazellen im Knochenmark exprimieren keinen Notch-Liganden und die Zellen entwickeln sich zu B-Zellen (Radtke et al., 2004).

Die Zellen sind anfangs noch nicht auf eine Entwicklungsrichtung festgelegt und Inaktivierung der beiden frühesten Transkriptionsfaktoren, die in Zellen auf dem Weg zur B-Zelldifferenzierung wirksam sind, PU.1 und Ikaros, führen zu Beeinträchtigungen im B- und T-Zell-Kompartiment (Welner et al., 2008). Der genaue Einfluss von Ikaros ist nicht bekannt, aber es wird eine Funktion beim Reprimieren von Genen durch nukleäre Relokalisation von Chromatin vermutet (Smith und Sigvardsson, 2004). Die Expression des TFs Pu.1 selbst scheint für die Differenzierung der CLPs eine Rolle zu spielen (Schebesta et al., 2002). Ein wichtiges Zielgen ist dabei der IL-7-Rezeptor. Ektopische Expression des IL-7-Rezeptors kann in Pu.1 defizienten Zellen deren Entwicklungsblock zumindest teilweise aufheben (Matthias und Rolink, 2005).

Zwei Transkriptionsfaktoren sind im Folgenden für die Expression weiterer B-Zell-spezifischer Gene entscheidend: *early B-cell factor* (EBF) und E2A. Zusammen induzieren sie in pro-B-Zellen die ersten Schritte der Rekombination der Gene des B-Zell-Rezeptors. Hierzu werden die Enzyme Rag1 und Rag2 (*recombination activated gene 1* bzw 2) exprimiert, die für die Vermittlung der gezielten Rekombination entscheidend sind. Durch die Expression einer Ersatz-leichten Kette, bestehend aus $\lambda 5$ und VpreB, und der Signalmoleküle Ig α (CD79A) und Ig β (CD79B) werden weitere Grundlagen für eine Signalgebung des Prä-B-Zell-Rezeptors gelegt (Schebesta et al., 2002). Die Bezeichnung der verschiedenen B-Zellstadien orientiert sich an der exprimierten Form des B-Zell-Rezeptors und ist schematisch in Abbildung 2A dargestellt.

Die Festlegung der Differenzierung erfolgt erst mit der Expression von *pax5* (=BSAP, *B-cell specific activator protein*). Zellen, in denen *pax5* deletiert wurde, können zu T-Zellen differenzieren (Cobaleda und Busslinger, 2008; Rolink et al., 1999). Unter dem Einfluss von Pax5 dagegen setzen die Zellen die VDJ-Rekombination der schweren Kette fort. Die Zellen, die einen prä-B-Zell-Rezeptor an der Oberfläche aufweisen, werden als prä-B Zellen bezeichnet. Sie haben eine erfolgreiche, produktive Rekombination ihrer schweren Kette

durchlaufen und exprimieren diese zusammen mit der Ersatz-leichten Kette, einem nicht rekombinierten Vorläufer der leichten Kette. Da membrangebundene Ig aufgrund einer sehr kurzen intrazellulären Domäne über keine Signaldomänen verfügen, erhalten die pro-B Zellen mittels zusätzlicher Adaptorproteine des BCR ein aktivierendes Signal. Diese Stimulation verhindert einerseits die Apoptose, die die Zellen ohne produktive Rekombination der schweren Kette durchlaufen, andererseits induziert sie die Rekombination der leichten Kette. Dieser Dualismus von Signalen über den BCR, die Apoptose-hemmende und gleichzeitig differenzierende Wirkung haben, ist ein Charakteristikum der B-Zellentwicklung. Pax5 spielt bei diesem Prozess eine wichtige Rolle, da es ohne Pax5 nicht zum Abschluss der Rekombination der schweren Kette kommt und weil erst dann ein Adaptorprotein des B-Zell-Rezeptors, BLNK, induziert wird, dessen Signal zur Weiterdifferenzierung nötig ist (Schebesta et al., 2002).

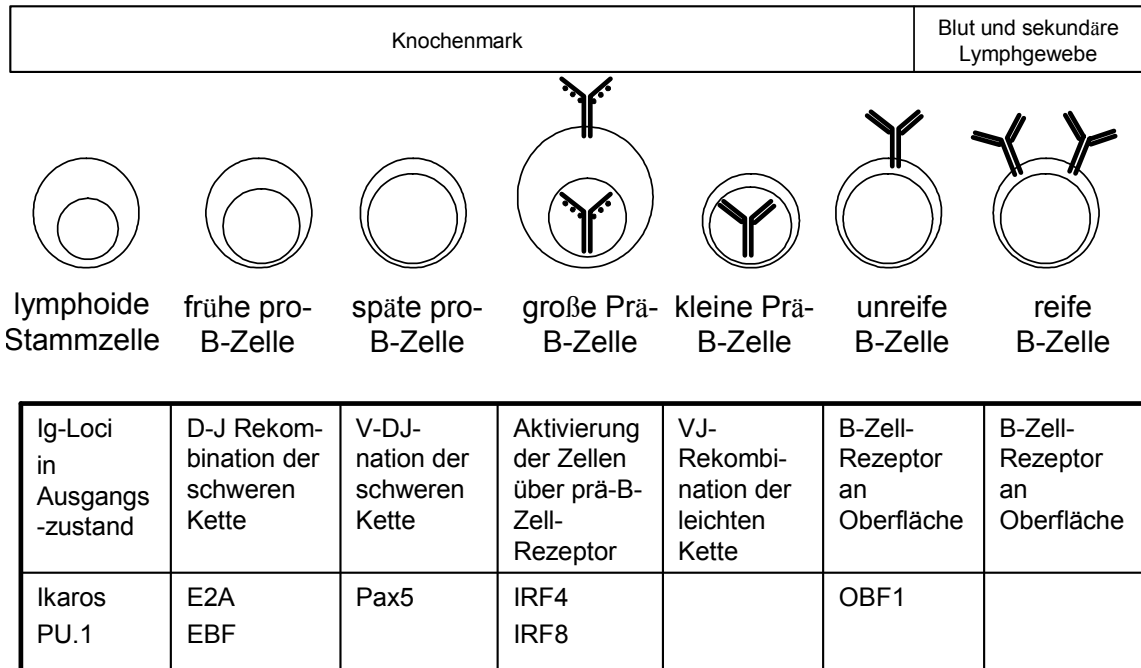
Für die weitere Entwicklung ist die negative Regulation der Ersatz-leichten Kette ein notwendiger Schritt, da nur so eine Selektion auf die produktive Rekombination der leichten Kette stattfinden kann. Die Transkriptionsfaktoren IRF4 und IRF8 (*interferon-regulatory factor 4* bzw. 8) scheinen hierfür koordiniert oder redundant verantwortlich zu sein (Matthias und Rolink, 2005).

Auch im Folgenden zeichnen sich B-Zellen durch eine hohe Sensitivität für apoptose-fördernde Signale aus (Opferman, 2008). Die Rekombination der leichten Kette, für die aufgrund der zwei verschiedenen Gene und der jeweils zwei vorhandenen Allele vier Möglichkeiten bestehen, ist der nächste entscheidende Schritt in der B-Zellentwicklung. Zellen, die keine rekombinierte leichte Kette mit der schweren Kette an der Oberfläche exprimieren, sterben den programmierten Zelltod. Zellen mit erfolgreich rekombinierter schwerer und leichter Kette werden als naive B-Zellen bezeichnet und exprimieren einen spezifischen B-Zell-Rezeptor an der Oberfläche, auf dessen tonisches Signal sie angewiesen sind um zu überleben (Kraus et al., 2004; Lam et al., 1997; Smith und Reth, 2004). In Abhängigkeit von der Expression von OBF-1 verlassen die B-Zellen das Knochenmark und zirkulieren im Blutstrom und im lymphatischen Gewebe, bis sie auf ein passendes Antigen treffen (Matthias und Rolink, 2005).

2.2 Die Keimzentrumsreaktion

Die Vorgänge im Keimzentrum sind in Abbildung 2B schematisch dargestellt. Treffen naive B-Zellen auf ein passendes Antigen und erhalten dabei zusätzliche Kostimulation von T-Zellen über eine Interaktion von CD40-Rezeptor und Ligand sowie durch Zytokine, werden sie aktiviert (Jacob et al., 1991). Die meisten der aktivierten B-Zellen produzieren daraufhin

A



B

Keimzentrum

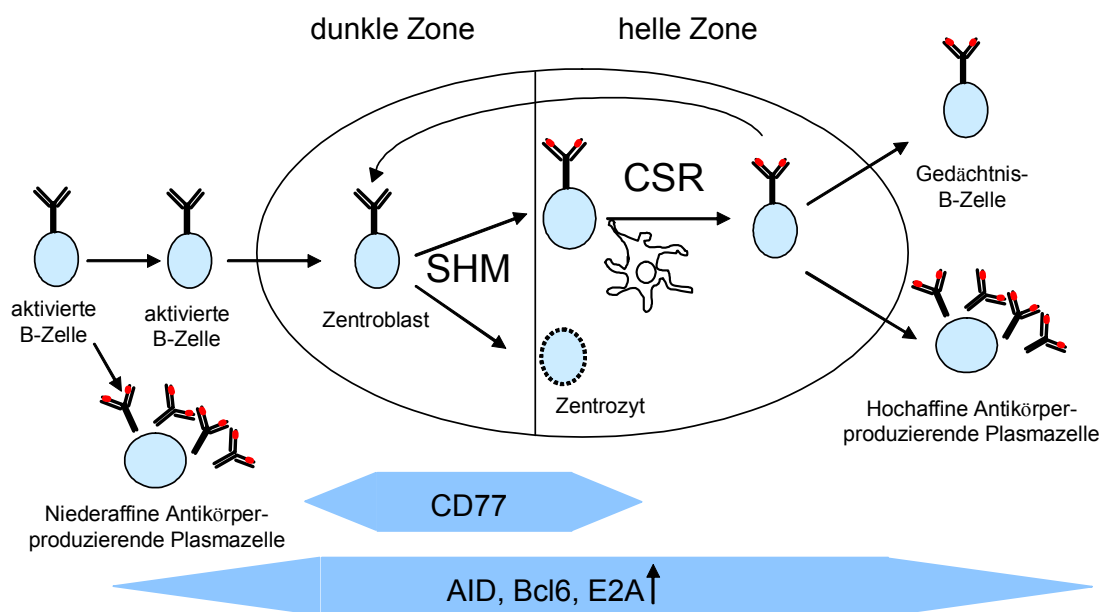


Abbildung 2: Frühe B-Zellentwicklung im Knochenmark und spätere Differenzierung im Keimzentrum nach Antigenkontakt

A) Dargestellt ist der Verlauf der B-Zellentwicklung im Knochenmark, dabei ist für jeden Differenzierungszustand eine schematische Darstellung der Zelle, der Zustand ihrer Ig-Gene und der für den jeweiligen Schritt notwendige Transkriptionsfaktor wiedergegeben. Die Expression des Transkriptionsfaktors ist zum Teil schon vor diesem Zeitpunkt nachweisbar (z.B. bei OBF1) und setzt sich meist noch länger fort.

B) Schematische Darstellung der Vorgänge im Keimzentrum, die nach Antigenkontakt von B-Zellen auftreten. Details im Text.

als kurzlebige Plasmazellen niederaffine Antikörper. Einige jedoch treten in den Follikeln der Lymphknoten in Wechselwirkung mit Follikulären Dendritischen Zellen (FDC) (Jacob und Kelsoe, 1992; Kuppers et al., 1993). Diese Stimulation führt zu einer starken Proliferation der B-Zellen und zur Expression des Transkriptionsfaktors Bcl6. Die proliferierenden Zellen

bilden ausgehend von einem oder wenigen B-Zellklonen ein Keimzentrum. Dieses kann in zwei Bereiche unterteilt werden (MacLennan, 1994):

In der dunklen Zone befinden sich hauptsächlich proliferierende B-Zellen, die dort als Zentroblasten bezeichnet werden. Sie führen somatische Hypermutation durch (Pascual et al., 1994) und zeigen eine Expression des Oberflächenmarkers CD77 (Martinez-Valdez et al., 1996).

In der hellen Zone befinden sich neben B-Zellen auch FDC und T-Helferzellen. Die B-Zellen der hellen Zone werden als Zentrozyten bezeichnet und konkurrieren um Antigen, das ihnen von den FDC präsentiert wird. Zentrozyten mit niederaffinen Rezeptoren gehen zugrunde, da es ihnen nicht gelingt Antigen aufzunehmen und ihrerseits T-Helferzellen zu präsentieren (Gray, 1991; Kosco et al., 1988) damit diese das für das Überleben der Zellen notwendige Signal über den CD40-Rezeptor liefern (Kelsoe, 1995). Zentrozyten mit höher affinen Rezeptoren können je nach zusätzlicher Stimulation durch Cytokine zur CSR angeregt werden um dem Pathogen angepasste Effektorfunktionen erfüllen zu können (Liu et al., 1996). Die Zentrozyten verlassen entweder das Keimzentrum, um als Plasmazellen Antikörper zu produzieren, oder sie persistieren in der Peripherie als langlebige Gedächtniszellen um bei wiederholten Infektionen aktiviert werden zu können (Hollowood und Goodlad, 1998; Kelsoe, 1995). Es ist auch möglich, dass Zentrozyten zurück in die dunkle Zone des Keimzentrums migrieren und weitere Runden mit somatischer Hypermutation durchlaufen. Dies war lange Zeit aufgrund mathematischer Modelle der Mutationsfrequenz vorhergesagt worden, aber erst in jüngster Zeit konnten moderne Methoden die hohe Mobilität der Zellen im Keimzentrum aufzeigen (Schwickert et al., 2007). Gleichzeitig stellen die Befunde die strikte Unterscheidung von Zentroblasten und Zentrozyten in Frage, zumal bei Zellsortierungen nur wenige mRNAs zwischen CD77-positiven und -negativen B-Zellen im Keimzentrum differentiell exprimiert werden (Hogerkorp und Borrebaeck, 2006; Nakayama et al., 2006). Vermutlich handelt es sich nicht um klar getrennte Zelltypen, sondern um transiente Zustände, die auf einer plastischen Regulation von Faktoren beruhen, die das Genexpressionsprogramm der Zellen sowie die genetischen Prozesse z.B. die SHM steuern.

2.3 Die Somatische Hypermutation

Die Somatische Hypermutation als Prozess war schon länger bekannt, Ansätze zum Verständnis des Mechanismus gelangen aber erst nach der Entdeckung des wichtigsten daran beteiligten Proteins Aktivierung-induzierte Cytidin-Deaminase (AID). Vorher konnte man nur das Ergebnis der Aktivität von AID und der komplexen angeschlossenen Vorgänge

untersuchen, die sich in einer hohen Zahl an Mutationen in der variablen Region des rekombinierten Ig-Gens niederschlagen. Die dabei zu beobachtenden Mutationsfrequenzen sind mit 1×10^{-3} bis 1×10^{-4} Mutationen pro Basenpaar eine Million mal höher als die spontane Mutationsrate im menschlichen Genom (McKean et al., 1984; Rajewsky et al., 1987), allerdings führt die positive Selektion auf hochaffine Antikörper möglicherweise zu einer Überschätzung der durchschnittlichen Hypermutationsrate in Keimzentrumszellen.

Die Verteilung der Mutationen zeigt einen Anstieg ab etwa 150 Basenpaaren hinter dem Transkriptionsstart und erstreckt sich über eine Länge von 1500 bis 2000 Basen (Lebecque und Gearhart, 1990). Wie genau die Zielführung der Mutationen in diesen Bereich erfolgt, ist nach wie vor nicht genau bekannt. Verschiedene Ansätze werden im nächsten Kapitel über die Regulation der Hypermutation angesprochen (2.4).

Erste Hinweise auf den Mechanismus lieferte die Art der nachgewiesenen Mutationen. Punktmutationen überwiegen und treten hauptsächlich als Transitionsmutationen auf, bei denen jeweils Purin- bzw. Pyrimidinbasen untereinander ausgetauscht werden (Golding et al., 1987). Mit geringerer Häufigkeit sind jedoch auch Deletionen und Duplikationen zu beobachten (Goossens et al., 1998). 1999 wurde das Gen, das für AID kodiert, *aicda*¹ (Muramatsu et al., 1999) identifiziert und in der folgenden Zeit näher charakterisiert. AID gehört zur Apobec-Familie, deren Mitglieder Cytosin zu Uracil deaminieren können (Pham et al., 2005). Das Substrat ist dabei häufig RNA, so dass dies zunächst auch für AID angenommen wurde. *In vitro*-Assays zeigen jedoch eine Aktivität nur bei der Zugabe von einzelsträngiger DNA (Bransteitter et al., 2003; Chaudhuri et al., 2003) und die meisten aktuellen Publikationen arbeiten mit einem Modell, das DNA als Substrat für AID postuliert. Sukzessive Schritte greifen an diesen initialen Läsionen an und generieren dabei das beobachtete Spektrum von Mutationen.

Die essentielle Rolle von AID konnte in *AID*-defizienten Mäusen gezeigt werden, deren B-Zellen weder SHM noch CSR durchführen können (Muramatsu et al., 2000). Patienten mit Mutationen innerhalb des *AID*-Gens erkrankten an der autosomal rezessiven Form des Hyper-IgM-Syndroms-2 (HIGM2) und zeigen eine erhöhte Produktion niedrig affiner unmutierter IgM-Antikörper sowie eine Keimzentrumshyperplasie (Revy et al., 2000).

Das gängige Modell (Di Noia und Neuberger, 2007) der DNA-Deaminierung ist in Abbildung 3 dargestellt und geht von einem initialen Schritt aus, bei dem während der Transkription der Ig-Gene die DNA einzelsträngig vorliegt und damit für AID zugänglich ist. AID deaminiert in dem zugänglichen Bereich Cytidin zu Uracil. Eine Replikation über das Uracil führt zu

¹ Das Gen wurde ursprünglich mit *aicda* bezeichnet. In neueren Publikationen ist die Verwendung der Abkürzung *AID* auch für das Gen üblicher und wird in dieser Arbeit deshalb so verwendet.

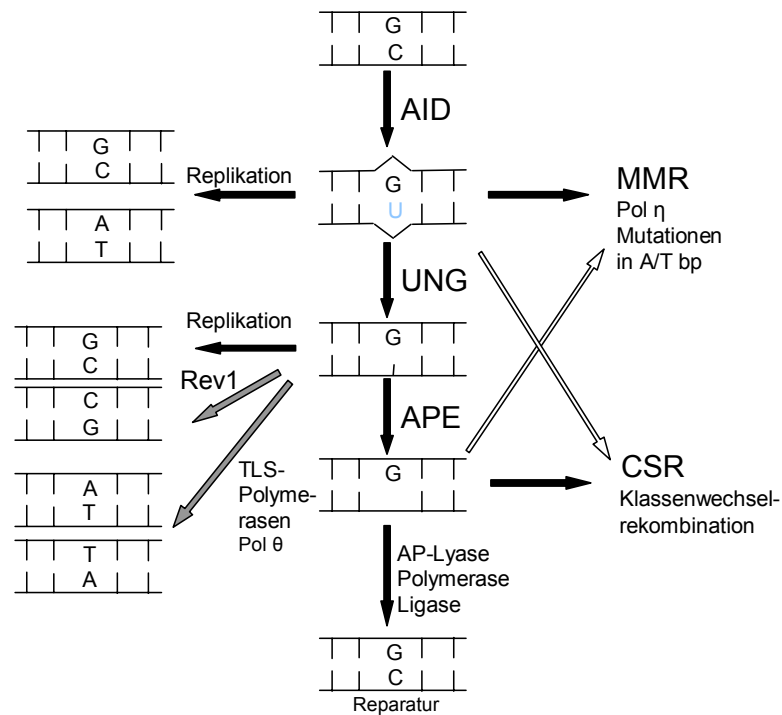


Abbildung 3: Modell der Somatischen Hypermutation (nach di Noia und Neuberger, 2007)

AID führt die initialen Läsionen in die DNA durch Deaminierung von Cytosin zu Uracil ein. Ausgehend von diesen Läsionen erfolgen parallel und/oder unabhängig voneinander verschiedene, fehleranfällige bzw. fehlerfreie Reparaturprozesse, die zu unterschiedlichen Endprodukten führen. APE apurinische/apyrimidinisch Endonuklease. Details im Text.

Transitionsmutationen. Da aber auch andere Prozesse zum Auftreten von Uracil in der DNA führen können, verfügen Zellen über einen potenten Mechanismus zu dessen Entfernung: die Basenexzisionsreparatur (BER) und das Enzym Uracil-Glykosylase (UNG). Defizienz von UNG führt zu einer gestörten CSR und einem veränderten Muster der somatischen Hypermutation. Diese Ergebnisse sind deutliche Indizien für die Annahme einer DNA-Deaminierung durch AID. Transversionsmutationen können erst nach der UNG-abhängigen Entstehung von apurinischen und apyrimidinischen Stellen (AP-Stellen) entstehen, wenn eine Replikation durch fehlerhaft-replizierende Polymerasen wie Pol θ, eventuell Pol ζ und Rev1 über diese Stellen den Einbau einer beliebigen Base erlaubt (Diaz et al., 2001; Faili et al., 2002a; Goodman und Tiffin, 2000; Jansen et al., 2006; Martomo et al., 2008; Ross und Sale, 2006; Zan et al., 2001). Prinzipiell ist auch eine Reparatur der AP-Stellen möglich. Es gibt jedoch auch eine sekundäre Phase der SHM, in der die nach der Deaminierung entstandene U/G-Fehlpaarung durch *mismatch*-Reparaturkomplexe (MMR) erkannt wird und ein längeres Stück rund um diese Stelle modifiziert wird. Hierbei entstehen auch Mutationen an A/T Basenpaaren, die für AID selbst nicht zugänglich sind. Eine wichtige Rolle spielt hierfür die fehlerhafte Polymerase Pol η (Delbos et al., 2007).

Für die CSR dienen die durch AID eingeführten Läsionen als Substrat für Einzelstrangbrüche. Liegen weitere Brüche in der näheren Umgebung, kommt es zu Doppelstrangbrüchen, die durch eine veränderte Konformation des gesamten Locus ein Verbinden von DNA-Strängen aus unterschiedlichen speziellen Schalter-Regionen vor den Genen der konstanten Teile der Ig-Kette ermöglichen (Nambu et al., 2003). Die dabei deletierten DNA-Fragmente sind als zirkulär geschlossene *switch-circles* nachweisbar (Liu et al., 1996) (siehe auch Abbildung 1). Interessant am Mechanismus der SHM ist besonders, dass neben AID als Initiator der Läsionen verschiedene DNA-Reparaturwege daran beteiligt sind Mutationen in die Ig-Gene einzufügen. Wie genau dies gesteuert wird, ist erst in Ansätzen bekannt. Es konnte gezeigt werden, dass der Rad6-Weg hierfür eine Rolle spielt, indem er durch Mono- und Polyubiquitinierung der Replikationsplattform PCNA (*proliferation cell nuclear antigen*) die Rekrutierung verschiedener Polymerasen für die Replikation steuert und dadurch zur Entscheidung zwischen fehlerfreien und fehlerhaften Reparaturwegen beiträgt (Arakawa et al., 2006; Bachl et al., 2006; Langerak et al., 2007). Die zeitliche und räumliche Kontrolle dieser Mechanismen, die nötig ist um Mutationen in anderen Genen zu verhindern, ist bisher nicht bekannt.

2.4 Regulation der somatischen Hypermutation

Die Regulation der Hypermutation verläuft auf verschiedenen Ebenen. Die Beschränkung der Expression und Kontrolle der Aktivität von AID in Keimzentrums-B-Zellen ist ein global wirksamer Mechanismus. Komplexer ist die Frage, wie die Zielführung von AID und anderer beteiligter Proteine, wie zum Beispiel fehlerhafter Polymerasen, an den Ig-Locus funktioniert. Diese Frage ist gleichbedeutend mit der Untersuchung von Faktoren, die den Immunglobulinlocus in hypermutierenden Zellen von anderen Genen unterscheiden. Hierfür kommen unter anderem Unterschiede in der Sequenz, in der Präsenz regulatorischer Elemente, in der Chromatinstruktur oder in der Aktivität des Ig-Locus in Frage. Auch eine Kombination verschiedener dieser Möglichkeiten ist denkbar.

Die Beschränkung der AID-Aktivität wird durch weitgehende Eingrenzung der Expression auf aktivierte B-Zellen (Muramatsu et al., 1999), die Retention im Cytoplasma (Cattoretti et al., 2006a), die Aktivierung durch Phosphorylierung (Basu et al., 2005), den zügigen Abbau von nukleärem AID (Aoufouchi et al., 2008) und weitere noch unbekannten Faktoren gewährleistet (Muto et al., 2006). Verschiedene Transkriptionsfaktoren steuern sowohl die weitgehend B-Zell-spezifische Expression von AID als auch die Induktion nach Stimulation der B-Zelle durch CD40 und IL-4 (Dedeoglu et al., 2004).

Trotz der Identifikation verschiedener AID-Interaktionspartner konnte bisher keiner gefunden werden, der für die Rekrutierung speziell an den Ig-Locus verantwortlich sein könnte. Auch spezifische DNA-Sequenzen für die Zielführung von Mutationen konnten innerhalb der Ig-Loci bisher nicht identifiziert werden. AID deaminiert zwar bevorzugt Basen innerhalb eines DGYW-Motivs, das als *Hotspot* bezeichnet wird (Betz et al., 1993; Rogozin und Kolchanov, 1992), aber dieses Motiv tritt auch in anderen Genen auf. Außerdem werden verschiedene *Hotspots* unterschiedlich stark mutiert, was auf einen Einfluss anderer Faktoren oder umgebender Sequenzen hindeutet (Bachl et al., 1997). Ein starkes Indiz, das gegen die Existenz spezifischer Sequenzen innerhalb des Ig-Locus spricht, ist auch die Tatsache, dass der Austausch des Ig-Gens zu Mutationen in dem eingesetzten Gen führt (Yelamos et al., 1995), was für die Untersuchung von Hypermutationsprozessen auf Reportergenen von entscheidender Wichtigkeit ist.

Versuche, bei denen bekannte regulatorische Elemente des endogenen Ig-Locus auf Reporterkonstrukten systematisch deletiert oder verändert wurden, zusammen mit Daten aus Analysen des endogenen Locus lieferten widersprüchliche Ergebnisse über die Bedeutung der verschiedenen regulatorischen Elemente der Ig-Gene für die SHM-Aktivität (Odegard und Schatz, 2006). Am besten untersucht ist der Ig-kappa-Locus, der über einen intronischen Enhancer (iEk), eine *matrix attachment region* (MAR), und einen 3'kappa Enhancer (3'Ek) verfügt, die in Deletionsexperimenten essentiell für die SHM eines Ig-kappa-Transgens sind. Dies trifft jedoch nicht für Veränderungen des endogenen Locus zu, was ein Hinweis auf weitere unbekannte Elemente mit möglicher redundanter Funktion ist (Yang et al., 2006). Ein wichtiger Einfluss von Enhancern auf die Ig-Gene ist eine verstärkte Transkription und obwohl Transkription im Gegensatz zu den bisher angesprochenen Faktoren keine spezifische Eigenschaft der Immunglobulingene ist, zeigt sich ein deutlicher Einfluss der Transkriptionsstärke der Ig-Gene auf die Hypermutationsrate (Bachl et al., 2001; Fukita et al., 1998). Andere stark transkribierte Gene in B-Zellen weisen jedoch keine Mutationen auf (Shen et al., 2000). Außerdem ist die Lage des Promotors für den Bereich der auftretenden Mutationen entscheidend. Das Einfügen eines zusätzlichen Promotors hinter der variablen Region in einem Ig-Gen führt zu einer zusätzlichen Mutationsregion (Peters und Storb, 1996). Die Art des verwendeten Promotors ist hierfür nicht relevant (Betz et al., 1994).

Unterschiede in der Chromatinstruktur von mutierenden und nicht-hypermutierenden Ig-Genen wurden untersucht und zeigten eine Korrelation zwischen dem Auftreten verschiedener Histonmodifikationen und der SHM-Aktivität. So waren nach der Induktion von SHM in einer Zelllinie die Acetylierung von H4 in der variablen Region erhöht, nicht jedoch in der konstanten Region (Woo et al., 2003). Auch die Regulation der Zugänglichkeit und Aktivität

der Enhancer im Verlauf der B-Zell-Entwicklung spiegelt sich in der differentiellen Regulation der Chromatinstruktur beispielsweise am kappa-Enhancer wieder (Nikolajczyk et al., 2007). Trotz dieser Ergebnisse gibt es keine direkten Hinweise darauf, dass sich die Ig-Gene durch spezifische Chromatinveränderungen auszeichnen, die eine Zielführung der SHM innerhalb des Genoms herbeiführen können. Die Öffnung der Chromatinstruktur ist zwar eine Voraussetzung für die Aktivität von AID, aber letztlich ist auch hierfür eine Rekrutierung von Histon-modifizierenden Enzymen an bestimmte Teile der Ig-Loci entscheidend (Downs et al., 2007). Einige Transkriptionsfaktoren sind in der Lage die Chromatinstruktur zu beeinflussen. Hierzu gehört auch E2A, für das im Zusammenhang mit Genkonversion ein Einfluss auf die Acetylierung von Histon 4 im Ig-Locus gezeigt werden konnte (Kitao et al., 2008).

Transkriptionsfaktoren können außerdem die Transkriptionsaktivität an den Ig-Genen verändern, die wie bereits erwähnt mit der SHM-Aktivität korreliert (siehe auch 2.6). Eine Analyse der Ig-Loci ergab unter anderem Bindestellen für verschiedene TF wie NF- κ B, Octamer-bindende Transkriptionsfaktorproteine und E2A (siehe auch Abbildung 4). Besonders für E2A gibt es Belege für einen Einfluss auf die SHM. So finden sich E2A-Bindestellen (E-Boxen) nicht nur in allen drei Ig-Genen, sondern auch in nicht-Ig-Genen, die niedrige Raten von Hypermutation aufweisen (Kotani et al., 2005). Interessanterweise waren Effekte von E2A in Transgenen nicht unbedingt von der Transkriptionsinduktion abhängig (Michael et al., 2003).

In jüngster Zeit wurden miRNAs als Regulatoren des Immunsystems beschrieben (Lindsay, 2008). Insbesondere miR-155 scheint einen Einfluss auf die CSR (Vigorito et al., 2007) und einen direkten Effekt auf AID zu zeigen (Dorsett et al., 2008; Thai et al., 2007), so dass in Zukunft aus diesem Bereich möglicherweise neue Impulse zum Verständnis der Regulation der somatischen Hypermutation zu erwarten sind.

2.5 Mechanismen der B-Zell-Lymphomentstehung

Da B-Zellen in ihrer Entwicklung zahlreiche genetische Veränderung ihrer Ig-Gene durchlaufen, kann eine Analyse der entsprechenden Genabschnitte in B-Zell-Lymphomen Aufschluß über den Ursprung des Tumors liefern. Zwei Drittel der B-Zell-Lymphome zeigen dabei einen Keimzentrums-Ursprung (Küppers, 2005). Die Lymphomzellen erscheinen zumindest teilweise in einem Differenzierungsstadium arretiert (Shaffer et al., 2002b), so dass auch ihre Genexpressionsmuster denen von normalen B-Zellen des entsprechenden Entwicklungsstadium entsprechen (Alizadeh et al., 2000). Ein Teil der Lymphome mit Keimzentrumsursprung zeigt dementsprechend auch fortdauernde somatische Hypermutation, unter anderem Follikuläre Lymphome (FL) (Cleary et al., 1986), der Keimzentrums-ähnliche

Subtyp von Diffusen großzelligen Lymphomen (DLCL) (Lossos et al., 2000), noduläre Lymphozyten-reiche Hodgkin-Lymphome (Kuppers et al., 2002; Liso et al., 2006) und ein Teil der Burkitt-Lymphome (Denepoux et al., 1997; Sale und Neuberger, 1998). Eine besondere Bedeutung gewinnt die fortdauernde Hypermutationsaktivität in Lymphomen dadurch, dass sie hier genau wie in normalen Keimzentrums-B-Zellen auch andere Gene mutiert (Muschen et al., 2000; Pasqualucci et al., 1998; Shen et al., 1998). Lange Zeit galt die SHM von nicht-Ig-Genen als eine Überschussreaktion der Hypermutationsmaschinerie oder als Zeichen der Deregulation der Zielführung in Lymphom-Zellen oder (-Zelllinien). Eine Untersuchung an normalen murinen B-Zellen ergab jedoch eine Aktivität von AID in einer Vielzahl von Genen, wenn auch mit niedrigerer Frequenz als in Ig-Genen (Liu et al., 2008a). Ein Großteil der dabei eingeführten Schäden konnte in Zellen mit intakter Fehlpaarungs- und Basenexzisionsreparatur repariert werden. In einigen Genen jedoch, darunter beispielsweise *bcl6* zeigte sich keine oder eine geringere fehlerfreie Reparaturaktivität, so dass Mutationen akkumulieren konnten (Liu et al., 2008a). Schäden in nicht-Immunglobulin-Genen entstehen also regelhaft und werden in manchen Fällen unzureichend repariert. Bei dem kurzen Verbleib der Zellen im Keimzentrum ist der Einfluss dieser Mutationen möglicherweise begrenzt, dauert sie wie in Lymphomzellen jedoch an, kann sie zum Auftreten zusätzlicher onkogener Transformationen beitragen. Ein prägnantes Beispiel sind Burkitt-Lymphome, da in diesen eine Translokation des *c-Myc*-Gens in einen der Immunglobulinloci vorliegt und damit das Gen unter den Einfluss der Immunglobulinenhancer gelangt, was nicht nur zu einer deregulierten Expression (Boxer und Dang, 2001), sondern auch zu einer verstärkten Mutation des Gens führt (Albert et al., 1994; Johnston et al., 1991; Rabbitts et al., 1984).

Die überproportionale Beteiligung von Keimzentrums- und nach-Keimzentrums-B-Zellen an Lymphomen legt einen Zusammenhang zwischen Prozessen im Keimzentrum und der Entstehung von Lymphomen nahe. Da es im Zuge der SHM gelegentlich und im Rahmen der CSR regelhaft zu Doppelstrangbrüchen der DNA kommt, ist eine fehlerhafte Reparatur dieser Brüche eine mögliche Ursache von Translokationen (Bemark und Neuberger, 2003; Goossens et al., 1998; Wilson et al., 1998). Gestützt wird diese Annahme auch durch die Lage einiger Translokationsbruchpunkte in Schalter-Regionen, in denen die Brüche für die CSR eingeführt werden (Edry und Melamed, 2007; Küppers, 2005; Lenz et al., 2007; Lieber et al., 2006) oder in Genen, die von aberranter Hypermutationsaktivität betroffen sind (Cario et al., 2000; Goossens et al., 1998).

AID kommt als zentralem Faktor beider Prozesse eine wichtige Rolle bei der Einführung der Brüche zu (Dorsett et al., 2007; Okazaki et al., 2007; Pasqualucci et al., 2008; Ramiro et al.,

2004), auch wenn vereinzelt AID primär eine Funktion bei der Progression des Tumors zugeschrieben wird (Unniraman et al., 2004).

Neben diesen B-Zell-inhärenten Faktoren sind auch Viren ein mögliches transformierendes Agens. Am besten untersucht ist hierbei das Epstein-Barr-Virus (EBV). Dieses γ -Herpesvirus infiziert überwiegend humane B-Zellen. Fast 90% der Weltbevölkerung sind infiziert, leben aber oft lebenslang symptomfrei. Das Virus persistiert in Gedächtniszellen und nur in 1-50 von 10^6 B-Zellen im peripheren Blut befindet sich EBV (Khan et al., 1996). Ein Zusammenhang zwischen EBV-Infektion und maligner Transformationen wurde aufgrund der hohen Assoziation von über 85% von EBV insbesondere mit einem Subtyp der Burkitt-Lymphome, der endemischen Form, angenommen (Young und Rickinson, 2004). Aber auch in den sporadischen BL sind bis zu 30% der Fälle positiv (Kuppers, 2003).

Es werden verschiedene Latenzen der EBV-Infektion unterschieden. In Latenz I, die in BL vorliegt, wird nur das EBV-Gen EBNA1 (*EBV nuclear antigen-1*) exprimiert, das den episomalen Erhalt des EBV-Genoms sicherstellt (Kelly et al., 2002). *In vitro* infizierte Zellen weisen dagegen eine Genexpression auf, die als Latenz III bezeichnet wird (Young und Rickinson, 2004). In diesem Zustand ist das EBV-Virus in der Lage Zellen zu immortalisieren, wie die Generierung von lymphoblastoiden Zelllinien (LCL) aus normalen B-Zellen zeigt (Chan et al., 1986). Für das transformierende Potential sind hierbei mehrere Proteine verantwortlich, LMP2A (*latent membrane protein*), LMP1 und EBNA2. Die viralen Proteine stellen konstitutiv aktive und ligandenunabhängige Formen des B-Zell-Rezeptors, CD40 und Notch1 dar (Thorley-Lawson, 2001). In Burkitt-Lymphomen wird EBNA2 gegenselektioniert, weil es die Expression des Ig-Locus und damit auch das translozierte *c-myc*-Gen negativ reguliert (Kelly et al., 2002).

Obwohl die viralen Proteine in ihren Signalen nicht vollständig mit den jeweiligen zellulären Homologen übereinstimmen (H. Kohlhof, Doktorarbeit), simuliert ihre Präsenz erfolgreich eine Aktivierung der B-Zelle durch ein Antigen, sowie die Kostimulation über den CD40 Rezeptor (Uchida et al., 1999). Diese Unabhängigkeit von äußerer Stimulation ist der entscheidende Faktor für die Möglichkeit zur malignen Transformation. So findet man beispielsweise EBV-positive Hodgkin-Lymphome (HL) ohne funktionellen BCR, die normalerweise durch Apoptose zugrunde gegangen wären (Kanzler et al., 1996; Mancao et al., 2005). HL sind zu 40% mit EBV-assoziert (Rickinson, 2002). EBV kann also einen Beitrag dazu leisten, dass B-Zellen mit schädlichen Mutationen überleben und so weitere Mutationen akkumulieren können.

EBV kann zumindest in Teilen sogar die Funktion zellulärer Gene in der B-Zellentwicklung ersetzen. In einem Mausmodell konnte die Expression von LMP2A eine normale B-

Zelldifferenzierung stützen, allerdings war die Expression des normalen Transkriptionsprogramms gestört. E2A, EBF und Pax5 wurden im Vergleich zum Wildtyp niedriger exprimiert (Portis und Longnecker, 2003; Rickinson, 2002). EBV kann also weitreichende Auswirkungen auf die B-Zellentwicklung haben und das normale Transkriptionsprogramm, das eine kontrollierte Differenzierung, Affinitätsreifung und Selektion ermöglicht, ausser Kraft setzen (Siemer et al., 2008).

2.6 Transkriptionsfaktoren im Keimzentrum

Wie in den letzten Abschnitten beschrieben haben Transkriptionsfaktoren eine herausragende Bedeutung für die B-Zellentwicklung. Sie sind aber auch teilweise Ansatzpunkte für maligne Transformationen oder Ziel für SHM außerhalb der Ig-Gene, was ihre Funktion verändern kann. Deshalb sollten im Rahmen dieser Arbeit verschiedene TF näher untersucht werden. Für die Auswahl wurden mehrere Kriterien herangezogen: das Expressionsmuster, die Rolle in der Lymphomentstehung und die Datenlage einer potentiellen Beteiligung an der SHM. Ein weiteres wichtiges Kriterium war auch die Präsenz von Bindestellen in den Genen von Immunglobulinen und AID.

Wie in Abbildung 4 gezeigt, weisen sowohl die Immunglobulingene, als auch das *AID*-Gen E-Boxen auf, an die die beiden in Keimzentrons-B-Zellen hoch exprimierten E2A-Formen

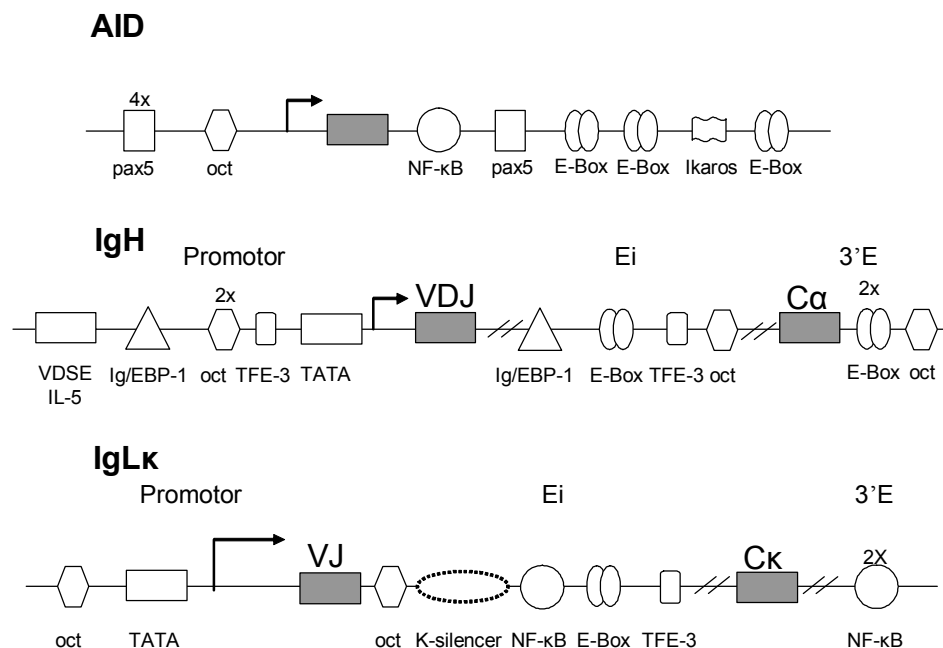


Abbildung 4: Transkriptionsfaktorbindestellen der AID- und Ig-Loci

(verändert nach (Gonda et al., 2003; Staudt und Lenardo, 1991; Yadav et al., 2006; Yang et al., 2006))
Abbildung ist nicht maßstabsgerecht. Die Bindestellen insbesondere der Ig-Loci sind nicht alle funktionell bestätigt und es wurden Elemente weggelassen, die keiner Gruppen von TF als Bindestelle zugewiesen werden können. E-Boxen können verschiedene Proteine binden, unter anderem E12, E47, ITF1 und ITF2. An TFE-3 Bindestellen kann auch USF binden. Oct steht für OCTAMER-Motif und kann verschiedene Proteine mit POU-Domäne binden, für B-Zellen wurde Oct-2 als wichtigster Faktor isoliert. Das VDSE-Element wird über IL-5 induziert. NF-κB-Bindestellen können verschiedene Dimere der NF-κB-Familie binden. IgEBP-1 weist Ähnlichkeiten mit C/EBP auf und ist ein ubiquitär exprimiertes Enhancer-Protein.

E12 oder E47 binden können. Pax5-Bindestellen sind nur im *AID*-Gen eingezeichnet, es wurden aber auch Bindestellen im IgH-3'Enhancer gefunden (Singh und Birshstein, 1993), deren Position in Relation zu den anderen Elementen unbekannt ist, weshalb sie nicht in die Übersicht aufgenommen wurden. E12/E47 und Pax5 erfüllen die aufgestellten Auswahlkriterien und wurden daher als Transkriptionsfaktoren in dieser Arbeit berücksichtigt.

Auch Bcl6 wurde näher betrachtet, obwohl keine Bindestellen für Bcl6 in den oben erwähnten Genen gefunden wurden. Bcl6 wird spezifisch im Keimzentrum exprimiert und könnte, auch ohne direkte Transkriptionseffekte auf die AID- oder die Ig-Expression, andere Faktoren der somatischen Hypermutation wie Reparaturkomplexe beeinflussen.

Als weiterer Faktor wurde c-Myc in dieser Arbeit berücksichtigt. C-Myc stellt im verwendeten experimentellen System wegen der Untersuchung von BL-Zelllinien einen wichtigen Einflussfaktor dar.

Im Folgenden werden die in der Arbeit untersuchten Transkriptionsfaktoren kurz dargestellt, sowie mögliche andere Kandidaten für weitergehende Experimente angesprochen.

Bcl6

Bcl6 ist ein Zinkfingerprotein und Transkriptionsrepressor mit einer geringen Zahl von bestätigten transkriptionellen Zielgenen (Niu, 2002). Es kann einerseits über eine Bindestelle, deren Sequenz mit der von STAT-Protein-Bindestellen überlappt, direkt an DNA binden, andererseits auch an Korepressorkomplexe binden und Histondeacetylasen rekrutieren (Dent et al., 2002). Bcl6 nimmt wegen seiner in B-Zellen aufs Keimzentrum beschränkten Expression und seiner Repression von Blimp1 (*B-Lymphocyte induced maturation protein*, auch PRDM1 genannt), dem wichtigsten Transkriptionsfaktor der Plasmazelldifferenzierung, eine zentrale Rolle innerhalb des Keimzentrumstranskriptionsprogramms ein (Tunayaplin et al., 2004). *Bcl6*-defiziente Mäuse zeigen weder die Ausbildung von Keimzentren, noch SHM. Sie generieren jedoch Gedächtnis-B-Zellen (Toyama et al., 2002). Da der *Knockout* von *bcl6* nicht zu einem Block der B-Zellentwicklung führt, scheint Bcl6 weniger für die Differenzierung entscheidend zu sein, sondern als würden die Zellen durch Bcl6 im Keimzentrumsprogramm fixiert, bis geeignete Signale zum Abbau von Bcl6 führen und die Zellen weiterdifferenzieren. Zu dieser Annahme passen sowohl die Zielgene, neben *blimp1* unter anderem Zellzykluskontrollgene wie *CCND2* und *CDKN1B* (Niu, 2002), *TP53* (Phan und Dalla-Favera, 2004), *ATR* (Ranuncolo et al., 2007) und auch *p21* (Phan et al., 2005), als auch die Regulation der Bcl6 Expression, die sensitiv für Signale durch den B-Zell-Rezeptor (Niu et al., 1998), CD40 (Allman et al., 1996) und genotoxischen Stress (Phan et al., 2007)

ist. Vereinfacht gesagt könnte Bcl6 in Keimzentrums-B-Zellen sowohl die hohe Proliferation stützen und die Toleranz für genetische Schäden erhöhen, die beispielsweise während der SHM auftreten, als auch bei zu großen DNA-Schädigungen oder bei erfolgreicher Affinitätsreifung durch seinen Abbau den Weg bereiten für Apoptose oder Differenzierung. Einen direkten Einfluss auf die SHM gilt es noch zu untersuchen.

Bcl6 ist auch deshalb ein interessanter Faktor für diese Arbeit, weil es oft zu Hypermutationsaktivität im *bcl6*-Gen kommt (Pasqualucci et al., 1998), was wiederum einen Einfluss auf die Regulation von *bcl6* haben kann. So führten Veränderungen im *bcl6*-Gen in DLCL zu einem Verlust der negativen Autoregulation (Wang et al., 2002) oder der Desensibilisierung gegenüber CD40 (Saito et al., 2007). Die Hypermutation und die in einigen Lymphomen auftretenden Translokationen des *bcl6*-Gens machen Veränderungen möglich, die zu einem Arretieren der Zellen im Keimzentrumszustand führen könnten (Melnick, 2005). Deshalb werden für Bcl6 auch therapeutische Ansätze mit Inhibitoren erwogen (Polo et al., 2004; Prive und Melnick, 2006).

E2A

E-Proteine sind basische Helix-Loop-Helix (bHLH)-Transkriptionsfaktoren, die als Homo- oder Heterodimere über Bindung an E-Boxen Gene aktivieren können (Vitola et al., 1996). E2A (=TCF-3) wird in sehr vielen verschiedenen Geweben exprimiert und E-Boxen finden sich in den regulatorischen Bereichen von zahlreichen Genen, unter anderem in den Immunglobulin-Enhancern und im AID-Locus (Sayegh et al., 2003). In B-Zellen spielt das Gen *E2A*, das in den zwei Spleißvarianten E12 und E47 exprimiert wird, eine wichtige Rolle in der frühen B-Zellentwicklung (Kee et al., 2000; Kwon et al., 2008). *E2A*-defiziente Mäuse zeigen einen Block in der B-Zellentwicklung im Pro-B-Zellstadium (Bain et al., 1994). Zusammen mit EBF induziert E2A die ersten Schritte der VDJ-Rekombination und die Expression eines B-Zell-spezifischen Transkriptionsprogramms (Smith und Sigvardsson, 2004). Die E2A-Aktivität wird dabei durch Id-Proteine (*Inhibitor of differentiation*) negativ reguliert (Goldfarb et al., 1996). Da Notch die Ubiquitinierung und Degradation von E2A induziert, könnte die unterschiedliche resultierende Menge von E2A einer der frühen Differenzierungsunterschiede zwischen B- und T-Zellen darstellen, die beide prinzipiell E2A abhängig sind (King et al., 2007; Nie et al., 2008; Nie et al., 2003).

In Zentroblasten findet sich eine besonders hohe E2A-Expression, die unter anderem durch Vernetzung des B-Zell-Rezeptors induziert wird (Murre, 2005; Rutherford und LeBrun, 1998) und möglicherweise eine erhöhte E2A-Aktivität durch die Repression von Id2 durch Bcl6 (Niu, 2002). Im Keimzentrum reguliert E2A sowohl die Expression von AID (Sayegh et al.,

2003) als auch die CSR (Goldfarb et al., 1996). Ein positiver Einfluss auf SHM und Genkonversion konnte in einer Hühner-B-Zelllinie gezeigt werden (Conlon und Meyer, 2006; Kitao et al., 2008; Schoetz et al., 2006). Da jedoch beispielsweise für das *AID*-Gen nur die Sequenz der Exons evolutionär konserviert ist, nicht jedoch die umgebenden Sequenzen mit Bindestellen für regulatorische Elemente (Yadav et al., 2006), ist eine Bestätigung dieser Ergebnisse in humanen Zellen erforderlich. Experimente mit konditionalen *Knockout*-Mäusen von E2A im Keimzentrum ergaben eine Beeinträchtigung der Keimzentrumsentwicklung, aber die Generierung hoch-affiner Antikörper deutet auf eine noch vorhandene Hypermutationsaktivität hin (Kwon et al., 2008).

E-Boxen finden sich in den meisten Zielgenen aberranter Hypermutation (Kotani et al., 2005). Es sind verschiedene Translokationen des E2A-Gens bekannt, vor allem bei akuter lymphoblastischer Leukämie (Aspland et al., 2001; Jonveaux und Berger, 1991; Zhong et al., 2008) und E2A kann über seine HLH-Domäne mit anderen onkogenen transaktivierenden Proteinen interagieren (O'Neil et al., 2001). Außerdem wird eine mögliche Rolle als Tumorsuppressorgen erwogen, angesichts des Auftretens von Thymomen in E2A-defizienten Mäusen und der Möglichkeit in aus diesen Tumoren isolierte Zellen durch ektopische Expression von E12 oder E47 Apoptose auszulösen (Bain et al., 1997; Engel und Murre, 1999; Yan et al., 1997).

Neben der Modulation der Genexpression von AID und Immunglobulingenen ist der mögliche Einfluss von E2A auf die Zielführung der Hypermutationmaschinerie für weitere Studien besonders interessant.

Pax5

Das *paired box gene 5* (=BSAP, *B-cell-specific activator protein*) ist in seiner Expression innerhalb der hämatopoetischen Linie auf B-Zellen mit Ausnahme des Plasmazellstadiums beschränkt und für die Festlegung (*lineage commitment*) auf das B-Zelldifferenzierungsprogramm entscheidend (Krenacs et al., 1998). *Pax5*-defiziente Mäuse zeigen einen Block in der B-Zellentwicklung vor dem prä-B-Zellstadium (Urbanek et al., 1994). Die *pax5*-defizienten pro-B-Zellen können bis hin zur Generierung von T-Zellen und myeloiden Zelltypen rückdifferenzieren (Cobaleda und Busslinger, 2008; Rolink et al., 2000). Der *knockout* in reifen Hühner-B-Zellen führt zu einem Transkriptionsprogramm mit Plasmazellcharakteristika (Nera et al., 2006). Durch seine sowohl aktivierende als auch reprimierende Funktion, kann Pax5 B-Zell-spezifische Gene wie *CD19* und *CD79a* aktivieren (Cozma et al., 2007; Kozmik et al., 1992) und gleichzeitig Gene anderer Zelltypen unterdrücken wie *M-CSFR* (Chiang und Monroe, 2001) und *Notch-1* (Souabni et al., 2002).

Pax5 wird durch die koordinierte Aktivität von EBF und E2A in frühen pro-B-Zellen exprimiert und induziert Gene mit Funktionen in der Adhäsion, Migration und andere TF wie IRF-8, Spi-B und Bach2 (Holmes et al., 2008; Pridans et al., 2008; Schebesta et al., 2007). Zusammen mit E2A ist es im Keimzentrum für die Expression von AID verantwortlich (Gonda et al., 2003).

Pax-5 ist sowohl Ziel von Hypermutation (Pasqualucci et al., 2001), als auch an Translokationen in DLCL und anderen Lymphomen beteiligt (Busslinger et al., 1996; Cazzaniga et al., 2001). Insgesamt ist Pax5 durch die Vernetzung mit anderen Transkriptionsfaktoren für das Zusammenspiel der verschiedenen Prozesse wie Proliferation, Differenzierung, Signalgebung des B-Zell-Rezeptors und Veränderung der Ig-Gene durch VDJ-Rekombination und CSR ein zentraler Faktor für die Regulation der B-Zellentwicklung (Fuxa et al., 2004; Holmes et al., 2008).

Ein Einfluss auf die SHM wurde bisher noch nicht nachgewiesen.

C-Myc

C-Myc ist ein Protoonkogen mit einer überragenden Bedeutung für Proliferation und Wachstum von Zellen. Für diese Funktionen ist eine Dimerisierung mit dem Max-Protein notwendig. Das Dimer kann an DNA binden und eine Vielzahl von Genen aktivieren oder reprimieren. In verschiedenen Ansätzen zur Charakterisierung von Zielgenen wurden unterschiedliche Gene identifiziert (Dang, 1999; Schuhmacher et al., 2001) und in Untersuchungen zur genomweiten Bindung von c-Myc an spezifische Bindestellen wurde in über 10% der Gene eine hoch-affine Bindung nachgewiesen (Fernandez et al., 2003). Dieser hohen Anzahl regulierter Gene steht eine eher schwache Transaktivierungseffizienz gegenüber, die in den wenigsten Fällen mehr als eine zwei- bis dreifache Erhöhung der Expression des Zielgens zur Folge hat (Cole und McMahon, 1999). Es sind jedoch auch primär nicht-transkriptionelle Effekte von c-Myc zum Beispiel durch eine Interaktion mit Proteindegradationswegen und Replikationsursprüngen belegt (Albert et al., 1994; Dominguez-Sola et al., 2007; Gavioli et al., 2001).

Eine Deregulation der c-Myc-Expression ist wegen der dadurch ausgelösten unkontrollierten Proliferation gefährlich und eine hohe c-Myc-Expression kann zur Apoptose der Zellen führen (Adachi et al., 2001). C-Myc wird deshalb durch eine geringe mRNA-Stabilität und zügige Degradation des Proteins durch das Proteasom kontrolliert (Sears, 2004). Allerdings ist *c-Myc* in etwa 30% aller menschlichen Tumore durch Translokation, Mutationen oder andere Veränderungen dereguliert, was zu c-Myc-Überexpression, erhöhter Transaktivierung oder Stabilisierung führen kann (Albert et al., 1994; Gregory und Hann, 2000; Küppers et al.,

1999). Translokationen des *c-myc*-Gens wurden in verschiedenen Tumoren nachgewiesen. In BL kann der *c-myc*-Genlocus aus Chromosom 8 in einen der drei Ig-Loci, IgH auf Chromosom 14 (bei 80 % der BL), IgL κ auf Chromosom 2 oder IgL λ auf Chromosom 22 transloziert vorliegen (Kelly und Rickinson, 2007). Durch die Translokation gelangt das *c-myc*-Gen unter die Kontrolle der Ig-Regulatorsequenzen und es kommt zu einer deregulierten *c-myc*-Expression (Boxer und Dang, 2001) und teilweise zu einer fortdauernden Hypermethylierung von *c-myc* (Albert et al., 1994; Johnston et al., 1991).

Die Rolle von c-Myc im Keimzentrum ist umstritten. Obwohl die hohe Proliferationsrate von Keimzentrums-B-Zellen, die Häufigkeit von *c-myc*-Translokationen, die typischerweise in transkribierten Genen auftreten, und die negative Regulation von c-Myc durch Blimp-1 am Ende der Keimzentrumsreaktion eine Expression von c-Myc wahrscheinlich machen, konnte nur in einigen frühen Arbeiten eine starke Expression nachgewiesen werden (Cutrona et al., 1997; Martinez-Valdez et al., 1996), während spätere detailliertere Untersuchungen sie in Frage stellten (Klein et al., 2003; Shaffer et al., 2001).

Da die Untersuchungen dieser Arbeit jedoch an hypermutierenden Burkitt-Lymphomen durchgeführt werden sollten, war die Berücksichtigung von c-Myc wegen seiner transformierenden Eigenschaften auf diese Zelllinien unbedingt notwendig.

Andere Transkriptionsfaktoren

Neben den bisher angesprochenen kommen eine Reihe anderer TF für weitere Untersuchungen in Frage.

Eine Analyse der putativen TF-Bindestellen, die für Ig-Gene beschrieben wurden, legt die Untersuchung der TF Oct-1 oder Oct-2 nahe, die an die OCTAMER-Elemente binden. Interessant erscheint auch der Transkriptionsfaktor OBF1 (=BOB1, OCA-B und POU2AF1), der an Oct-1 und Oct-2 binden kann und dessen *knockout* in Mäusen die Keimzentrumsentwicklung und T-Zell-abhängige Immunantwort stört (Bartholdy et al., 2006). Eine Beteiligung von OBF1 an der SHM oder Lymphomentstehung wurde bisher nicht beschrieben, so dass andere TF vordringlich untersucht wurden.

Die spezifische Expression von a-Myb in Keimzentrums-B-Zellen und die veränderten Keimzentren in *a-myb*-defizienten Mäusen machen a-Myb zu einem weiteren Kandidaten für weitere Untersuchungen (Golay et al., 1998; Vora et al., 2001). Es ist jedoch wenig über a-Myb bekannt und zum Teil ist deshalb die Verfügbarkeit von Agentien zu seiner Untersuchung eingeschränkt.

Ein weiterer Faktor, für den sowohl Bindestellen in den Ig-Genen als auch die Regulation von AID sprechen, ist NF- κ B (Dedeoglu et al., 2004; Zhou et al., 2003). Hierbei erweist sich der

Versuchsansatz aufgrund der Vielzahl der beteiligten Proteine, die alle in B-Zellen exprimiert werden und in verschiedenen Zusammensetzungen als aktive Dimere auftreten können, als sehr komplex (Johnson et al., 2005). Mäuse, die defizient für einzelne Untereinheiten sind, zeigen zum Teil eine gestörte B-Zellentwicklung und ein Fehlen von Keimzentren (Matthias und Rolink, 2005). Die zentrale Funktion von NF- κ B liegt zudem in der Aktivierung anti-apoptotischer Gene im Rahmen der positiven Selektion funktioneller B-Zellen (Sen, 2006). In BL-Zelllinien ist die NF- κ B-Signalgebung, vermutlich durch das Einwirken von c-Myc, niedrig (Dave et al., 2006; Schlee et al., 2007).

Letztlich können aber Erkenntnisse, die mit der angewandten Methodik gewonnen wurden, verwendet werden um in dem etablierten experimentellen System weitere Faktoren zu untersuchen.

2.7 Modellsysteme zur Untersuchung der somatischen Hypermutation

Die SHM kann in verschiedenen experimentellen Systemen untersucht werden, die sich jeweils für verschiedene Fragestellungen eignen und hier im Folgenden kurz vorgestellt werden.

Wichtige Erkenntnisse über die SHM als Prozess der Affinitätsreifung können nur durch Untersuchungen in Mäusen erreicht werden, da hier ein intaktes Keimzentrum den Ablauf von positiven und negativen Selektionsprozessen von B-Zellen erlaubt und damit eine Beurteilung beispielsweise der Kinetik der Entstehung hoch-affiner Antikörper oder bestimmter Antikörperklassen möglich ist. Durch die häufige Untersuchung von B-Zellen aus Peyer Plaques, die Teil des Darm-assoziierten lymphatischen Gewebes sind (GALT), kann die Keimzentrumsentwicklung keiner bestimmten Infektion zugeordnet werden, weil durch Darmbakterien eine ständige Stimulation erfolgt (Butcher et al., 1982; McGhee, 2005). Außerdem unterscheiden sich Peyer Plaques von anderen sekundären lymphatischen Organen dadurch, dass sie fast ausschließlich einen Klassenwechsel nach IgA stützen und hierfür eine spezielle Mikroumgebung aufweisen (Casola und Rajewsky, 2006; Weinstein und Cebra, 1991).

Dennoch konnten durch (zum Teil konditionale) *knockout*-Experimente in Mäusen wichtige Belege für den Mechanismus der SHM und der Beteiligung verschiedener Reparaturproteine gewonnen werden. Mäuse wären auch ein geeignetes Modell zur Untersuchung von aus dem Keimzentrum abstammenden Lymphomen, allerdings konnte bisher kein Lymphom

identifiziert oder induziert werden, das wie eine Reihe humaner Tumore eine fortdauernde Hypermutationsaktivität aufweist.

Eine Alternative zu Mausmodellen sind *in vitro*-Untersuchungen in Zelllinien. Hierfür wurden in erster Linie humane Burkitt-Lymphomzelllinien und die Hühner-B-Zelllinie DT40 verwendet. Diese Zelllinie zeichnet sich durch eine hohe Targeting-Effizienz aus, die *knockout*-Untersuchungen erleichtert. Die SHM-Aktivität von DT40-Zellen ist jedoch gering, da die Antikörperdiversifikation in Hühner-B-Zellen primär durch Genkonversion erfolgt (Arakawa et al., 2004; Buerstedde und Arakawa, 2006). Nach Deletion der Pseudogene steigt die Hypermutationsaktivität an, so dass entsprechende Klone für Untersuchungen der SHM verwendet werden können (Arakawa et al., 2004; Sale et al., 2001). Die spontane Generierung von IgM-negativen Zellen in einer IgM-positiven Kultur wird bei dieser Methode als Maß für die SHM verwendet. Durch die Analyse einer größeren Zahl von Klonen sind quantitative Vergleiche möglich (Arakawa et al., 2006; Bachl et al., 2006). Allerdings werden bei diesem Ansatz nur schädliche Mutationen erfasst. Die DT40-Zelllinie ist zur Untersuchung des Mechanismus der SHM geeignet, aber nur bedingt für deren Regulation, da sich beispielsweise die antigenunabhängige Ig-Gendiversifikation in der Bursa von Hühnern deutlich von den Prozessen im menschlichen Keimzentrum unterscheidet (Withers et al., 2005). Hinzu kommt die Transformation von DT40 durch das AL (*avian leukosis*)-Virus, das zu einer hohen Expression von c-Myc führt (Buerstedde et al., 1990; Swanberg et al., 2004).

Ein humanes Zellsystem ist dagegen für die geplanten Experimente besser geeignet. Für Burkitt-Lymphomzelllinien wurde früh eine fortdauernde Hypermutationsaktivität nachgewiesen und sie erscheinen durch ihren konservierten Keimzentrumphänotyp als geeignetes Modellsystem. Zur Analyse der SHM wurden in ersten Experimenten die Zellen vereinzelt und nach einer gewissen Zeit die Unterschiede in den Immunglobulingensequenzen der Klone ermittelt. Erstmals durchgeführt wurde dies in der Zelllinie BL2, in der durch Signale *in vitro* eine SHM-Aktivität induziert werden konnte (Denepoux et al., 1997). Seither wurde es auch in verschiedenen anderen Zelllinien zur Charakterisierung ihrer Hypermutationsaktivität verwendet (Sale und Neuberger, 1998). Diese Methode erfasst zwar alle auftretenden Mutationen, ist aber aufgrund der großen Zahl von Sequenzierungen relativ aufwändig.

Versuche, den in DT40 etablierten experimentellen Ansatz der IgM-Oberflächenanalyse in BL-Zellen anzuwenden, waren nur teilweise erfolgreich (J. Unterlehberg, Diplomarbeit). Insbesondere die negative Regulation des B-Zell-Rezeptors durch EBV schränkte die Anwendbarkeit ein. Bei schwach hypermutierenden Zellen waren die für Aussagen

notwendigen Zeiträume zudem sehr lang, was die Empfindlichkeit gegenüber Veränderungen während langer Kulturzeiträume erhöhte.

Eine Alternative zu diesen Systemen stellt die Verwendung von Transgenen dar. Ein von J. Bachl etablierter Hypermutationsassay beruht auf einem episomalen Vektor mit einem Ig-Kappa-Promotor mit allen bekannten Enhancern als Regulationselementen und einem GFP-Gen als Reporter (Bachl und Olsson, 1999). Da sich gezeigt hatte, dass die somatische Hypermutation sequenzunabhängig auch andere Gene im entsprechenden regulativen Umfeld trifft, wird die Veränderung des Reporters mit der Hypermutation der endogenen Gene in direkte Beziehung gesetzt. Ein in einen Hypermutations-Hotspot eingesetztes Stoppcodon, das durch Mutation so verändert werden kann, dass ein funktionelles Protein entsteht, erlaubt eine direkte Analyse mittels FACS-Untersuchung. Voraussetzung ist die Transfizierbarkeit der zu untersuchenden Zelllinie. Für diese Untersuchung kann ähnlich wie im IgM-Assay eine Analyse von Einzelzellklonen zu einem Zeitpunkt herangezogen werden, es ist jedoch auch eine Verlaufsanalyse möglich, bei der der Anteil GFP-positiver Zellen in regelmäßigen Abständen ermittelt wird und die Zunahme über die Zeit dargestellt werden kann (Bachl et al., 1999; Rückerl et al., 2006). Ein Nachteil dieser Methode ist die Notwendigkeit, große Mengen Zellen einer FACS-Analyse zu unterziehen, da sich im Gegensatz zu den anderen Methoden nur die Hypermutationsfrequenz für ein einzelnes Basenpaar auf den Reporter auswirken kann. Andererseits können bei ausreichenden Zellzahlen auch schwach-hypermutierende Zellen analysiert werden. Deshalb wurde dieser experimentelle Ansatz in dieser Arbeit für die Untersuchung der Hypermutationsaktivität herangezogen.

2.8 Zielsetzung

Die somatische Hypermutation ist sowohl ein wichtiger Aspekt der Affinitätsreifung als auch ein risikobehafteter Prozess, dessen Aktivität außerhalb der Ig-Gene in der Lymphomentstehung eine kritische Rolle spielt. Deswegen ist das Verständnis ihrer Regulation oder Hinweise auf deren Deregulation ein wichtiger Beitrag zur Aufklärung der Abläufe in normalen Keimzentren und in aus dem Keimzentrum abstammenden Tumoren wie den Burkitt-Lymphomen. In dieser Arbeit sollte der mögliche Einfluss von vier verschiedenen Transkriptionsfaktoren zunächst auf AID, den wichtigsten Faktor der Hypermutation und auf die Hypermutation selber untersucht werden. Hierfür wurde mit Bcl6 ein keimzentrumspezifischer Transkriptionsfaktor und mit E2A und Pax5 Faktoren, die einen bekannten Einfluss auf AID aufweisen, ausgewählt. Die Untersuchung von c-Myc ist wegen der Verwendung von Burkitt-Lymphomen ein wichtiger Aspekt, um eine mögliche

Deregulation von AID oder der SHM zu berücksichtigen. Hinweise auf die Bedeutung dieser Faktoren für die Hypermutationsaktivität sollten zunächst durch Korrelationsanalysen in verschiedenen auf ihre Hypermutationsaktivität charakterisierten Zelllinien gewonnen werden. Um den Einfluss der Transkriptionsfaktoren untersuchen zu können, sollten sie in sich ergänzenden Ansätzen in ihrer Expression positiv und negativ durch Überexpression und siRNA manipuliert werden und die Auswirkung dieser Manipulation auf AID und die fortdauernde Hypermutationaktivität untersucht werden. Dafür sollte die Manipulation innerhalb von Hypermutationsassays erfolgen.

Effekte von Bcl6, E2A und Pax5 könnten in solchen Experimenten einen Hinweis auf ihre Rolle während der Keimzentrumsreaktion liefern. Für die Untersuchungen an c-Myc stand zusätzlich der mögliche Einfluss von c-Myc auf das Keimzentrumstranskriptionsprogramm und die fortdauernde Hypermutation in Burkitt-Lymphomen im Vordergrund.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der Hypermutationsaktivität von B-Zellen

3.1.1 Darstellung des verwendeten Hypermutationsassays und dessen Verbesserung

Zur Charakterisierung der Hypermutationsaktivität von B-Zellen wurde ein von J. Bachl und C. Olsson entwickeltes Versuchssystem verwendet (Bachl und Olsson, 1999). Der Assay basiert auf einem GFP-Reporterkonstrukt, bei dem in ein GFP-Transgen (Reporter) ein vorzeitiges TAG-Stopp-Codon eingeführt wurde. Die Expression des verkürzten GFPs führt nicht zu einer detektierbaren Fluoreszenz der Zellen. Erst nach Veränderung des Stoppcodons, meist durch Punktmutation zu einem TAC-Codon (Bachl und Olsson, 1999), im Zuge der Hypermutationsaktivität der Zellen entsteht ein funktionelles GFP-Protein (Abbildung 5A), welches mittels FACS-Analysen nachgewiesen werden kann (Abbildung 5C). Das GFP-Gen ist unter Kontrolle eines Cytomegalovirus (CMV)-Promotors, der in B-Zellen zu einer starken Expression führt. Zusätzlich befinden sich Immunglobulinenhancer (intronischer und 3' Enhancer des λ -Lokus) auf dem Vektor, für die in einigen Systemen ein Einfluss auf Zielführung und Aktivität der SHM gezeigt werden konnte (Abbildung 5 und (Rückerl et al., 2006)). Der Erhaltung und episomalen Replikation des Vektors dienen die EBV-Elemente OriP und EBNA1. Um auf plasmidtragende Zellen selektieren zu können, enthält das Plasmid außerdem ein Hygromycingen unter Kontrolle eines Thymidinkinase (TK)-Promotors (Abbildung 5B).

Nach Transfektion des Vektors in die zu untersuchenden Zellen wird durch wiederholte FACS-Analysen der Anteil GFP-positiver Zellen an etwa einer Million lebender Zellen über einen Zeitraum von 30 Tagen gemessen. Nach dem Abschluss der Selektion, der normalerweise an Tag 10 bis 12 erfolgt und durch einen GFP-tragenden Vergleichsvektor ermittelt wird, ist der Anstieg des Anteils GFP-positiver Zellen ein Maß für die Hypermutationsaktivität der Zellen.

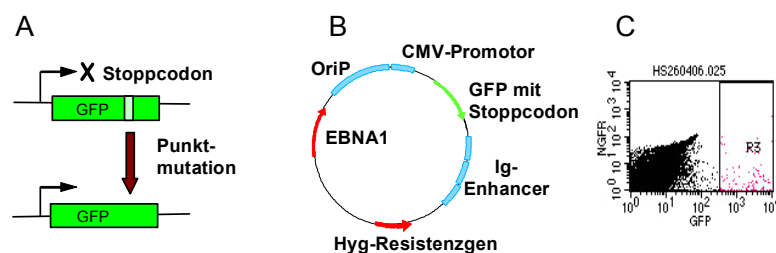


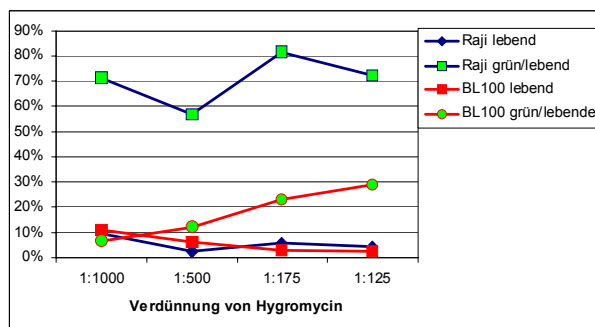
Abbildung 5: Reportersystem zur Bestimmung der Hypermutationsaktivität

A) Aufbau des Hypermutationseporters und Veränderung durch Hypermutation. **B)** Episomaler Vektor mit Hypermutationsreporter angetrieben von einem CMV Promotor und Ig-Enhancern (s. Text). **C)** Beispiel für eine FACS-Analyse von BL100-Zellen 20 Tage nach Transfektion mit dem Hypermutationsreporter. Gezeigt werden eine Million lebende Zellen sowie das Gate R3 in dem die GFP positiven Zellen liegen und gezählt werden.

Versuche mit dem von J. Bachl erhaltenen Vektor führten insbesondere in Zelllinien mit hoher Transfektionseffizienz zu guten Ergebnissen. In einigen Zelllinien gelang es jedoch nicht die Zellen erfolgreich zu selektionieren. Wie in Abbildung 6A für den Vergleich der Zelllinien Raji und BL100 zu sehen ist, war nur für die Raji-Zelllinie eine erfolgreiche Selektion möglich. Für den Versuch wurde ein GFP-tragender Vektor in beide Zelllinien transfiziert, nach drei Tagen der Transfektionsansatz geteilt und mit verschiedenen Mengen Hygromycin zur Selektion behandelt. Nach 10 Tagen Selektion zeigt sich in Raji-Zellen bereits bei der niedrigsten getesteten Konzentration von Hygromycin ein Anteil von mehr als 70% GFP-positiven Zellen innerhalb der lebenden Zellpopulation. Der Anteil lebender Zellen ist mit knapp 10% zwar niedrig, aber erst unterhalb von etwa 5% lebenden Zellen ist ein Absterben der Gesamtkultur im Verlauf eines Hypermutationsassays zu beobachten (Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu zeigt sich für die Zelllinie BL100 mit keiner Antibiotikakonzentration ein Anteil von mehr als 30% GFP-positiven Zellen und zusätzlich ist bei der Erhöhung der Hygromycinmenge der Anteil lebender Zellen zu gering für die Durchführung eines Hypermutationsassays.

Zur Verbesserung des vorhandenen Assays und um seine Anwendung für möglichst viele Zelllinien zu ermöglichen, wurde deshalb statt des TK-Promotors ein stärkerer Simian Virus 40 (SV)-Promotor vor das Hygromycingen in den Vektor kloniert (siehe Methodenteil 6.2.4). In Abbildung 6B ist deutlich zu erkennen, dass nach Umklonierung des Promotors sowohl der Anteil lebender wie auch der Anteil grüner Zellen für BL100 gesteigert werden konnte. Dies ermöglichte die Durchführung von Hypermutationsassays bei einer Konzentration von 200µg/ml Hygromycin. Auch für die Raji-Zelllinie führte die Veränderung des Vektors zu einer Verbesserung des Lebendzellanteils, was eine wichtige Voraussetzung für weitere Versuche darstellt.

A TK-Promotor



B SV-Promotor

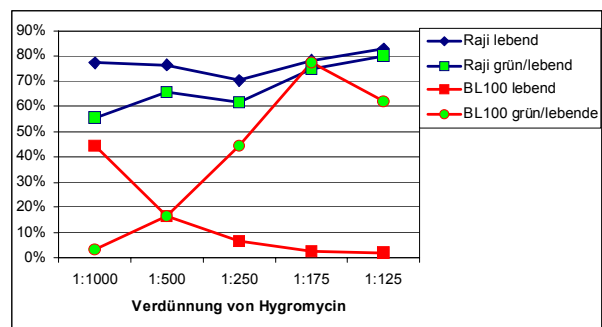


Abbildung 6: Test des verbesserten Hypermutationsreporters

Anteil lebender Zellen und Anzahl grüner lebender Zellen in Raji und BL100 Zellen nach 10 Tagen Selektion mit verschiedenen Konzentrationen Hygromycin (1:500 entspricht 100µg/ml) für **A)** den Vektor mit TK-Promotor und **B)** den neu-klonierten Vektor mit SV-Promotor

3.1.2 Charakterisierung der SHM-Aktivität verschiedener Zelllinien

Mit dem verbesserten Hypermutionsvektor konnten verschiedene Zelllinien, die in Tabelle 1 zusammengefasst wurden, auf mögliche Hypermutionsaktivität untersucht werden.

Die Zellen wurden mit dem Hypermutionsreporter transfiziert und 30 Tage lang regelmäßigen FACS-Analysen unterzogen. Die parallele Transfektion derselben Zellen mit einem GFP-Vektor diente als Transfektions- und Selektionskontrolle.

Die Ergebnisse der Hypermutionsassays werden in verschiedenen Graphen dargestellt (siehe Abbildung 7), da aufgrund der sehr unterschiedlichen Aktivitätsniveaus sonst die schwächer oder nicht-hypermutierenden Zelllinien nicht von der X-Achse zu unterscheiden wären. Die beiden oberen Graphen zeigen die Zelllinien, die als hypermutierend eingestuft werden können. Wie man am Beispiel der Zelllinie BL60 deutlich erkennen kann, ist der Verlauf des Graphen der am stärksten hypermutierenden Zelllinie Raji sehr ähnlich, aber auf wesentlich niedrigerem Niveau. Der Verlauf des Graphen für die Zelllinie HH514 ist unregelmäßiger als für die anderen Zelllinien, weil es aufgrund des geringen Anteils lebender Zellen innerhalb des Assays nicht möglich war die Zahl von einer Million lebender Zellen in jeder Messung zu erreichen und Schwankungen deshalb deutlicher zu Tage treten.

Tabelle 1: Übersicht über die verwendeten Zelllinien sowie Angaben zum Ursprung und EBV Status

Zelllinie	EBV-Status	Ursprung
Raji	+	BL-Zelllinie
BL100	-	BL-Zelllinie
BL60	+	BL-Zelllinie
Mutu III, Mutu (-)	+ (bzw. Verlust des EBV-Genoms)	BL-Zelllinie
P3HR1	+	BL-Zelllinie
HH514	+	BL-Zelllinie; Klon von P3HR1
BJAB	-	BL-ähnliche Zelllinie
BL70	-	BL-Zelllinie
DG75	-	BL-Zelllinie
P493.6	+	in vitro transformiert
EREB 2-5	+	in vitro transformiert
721	+	LCL
Nalm6	-	Prä-B-Zelllinie

BL: Burkitt-Lymphom; LCL: lymphoblastoide Zelllinie

Um den Vergleich hypermutierender und nicht-hypermutierender Zelllinien zu vereinfachen, wurde für den linken unteren Graph mit nicht-hypermutierenden Zelllinien dieselbe Skala gewählt wie für die schwach hypermutierenden oben rechts.

Die Zelllinie BJAB erscheint dabei in ihrem Verlauf ähnlich wie die hypermutierenden, weitere Versuche zeigten jedoch nur vereinzelte GFP-positive Zellen und keinen kontinuierlichen Anstieg. Daher wurde die Zelllinie als nicht bis schwach mutierend eingestuft. Für die Zelllinie BL70 aus dem zu untersuchenden Zelllinienset ist keine Kurve dargestellt, sie ist im Rahmen der Publikation zum Originalreporterassay bereits getestet worden und zeigt keine Hypermutationsaktivität (Rückerl et al., 2006).

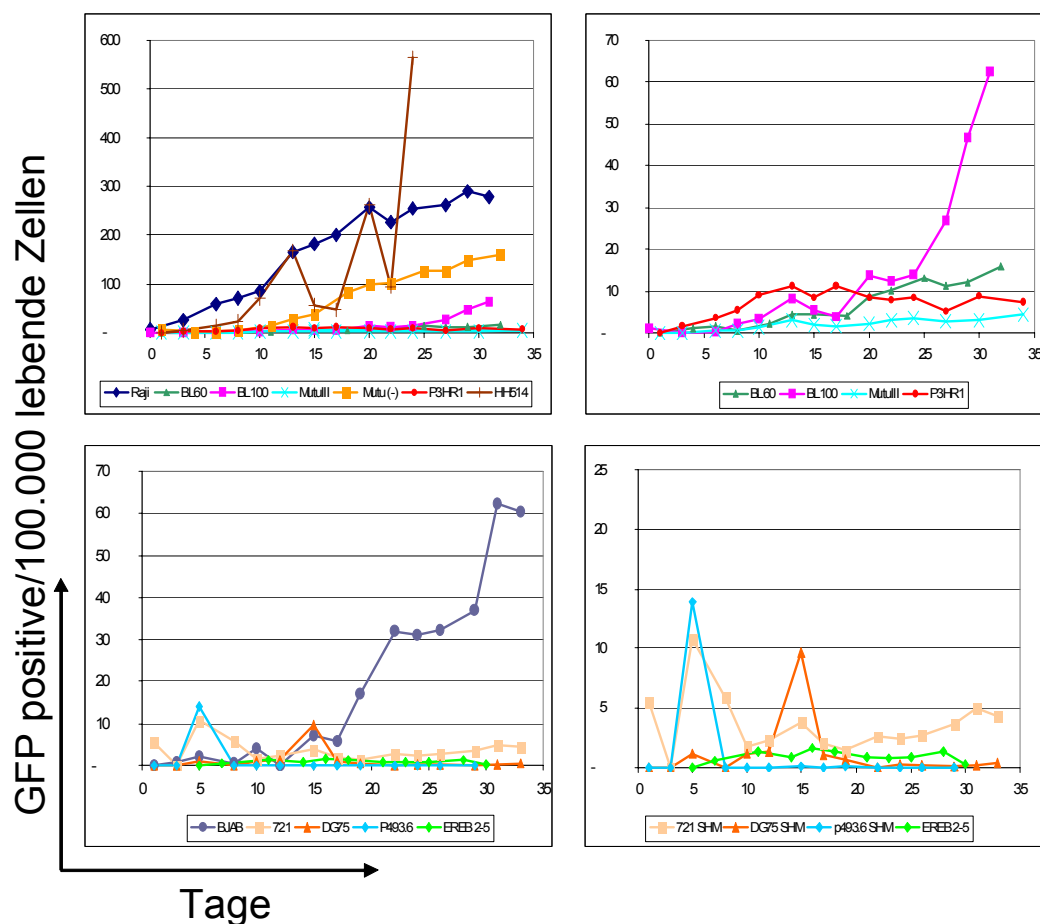


Abbildung 7: Vergleich der Hypermutationsaktivität verschiedener Zelllinien

Die Anzahl GFP positiver Zellen pro 100000 lebende Zellen wurde für die verschiedenen Zellen über einen Zeitraum von einem Monat ausgewertet. Die Skalen der Ordinatenachse wurden so gewählt, dass für alle Zelllinien der Verlauf der Graphen deutlich wird.

3.1.3 Variabilität in isogenen Zellsystemen und für unabhängige Assays in derselben Zelllinie

Da im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden sollte, welchen Einfluss verschiedene Transkriptionsfaktoren auf die SHM-Aktivität haben, war im Vorfeld dieser Untersuchungen von Interesse, wie groß die Plastizität dieses Prozesses vor demselben genetischen Hintergrund sein kann.

Die zwei Zelllinien Mutu(-) und MutuIII sind dafür ein geeignetes Modell, weil sie ein isogenes Zellsystem darstellen. Die Zelllinie Mutu wurde ursprünglich als EBV-positive Zelllinie aus einem Burkitt-Lymphom isoliert. Wie andere EBV-positive Zelllinien zeigt sie eine Latenz III und den Phänotyp einer LCL. In diesem Zustand als MutuIII bezeichnet zeigt sie eine schwache aber nachweisbare Hypermutionsaktivität (s. Abbildung 8A). In Kultur kam es in einer Subpopulation zu einem spontanen Verlust des EBV-Genoms. Diese Zelllinie wird als Mutu(-) bezeichnet und zeigt eine deutliche höhere Hypermutionsaktivität. Der gemeinsame genetische Ursprung dieser Zelllinien wurde durch eine Sequenzierung der VDJ-Region des V-Gens bestätigt (Daten nicht gezeigt).

Auch innerhalb einer Zelllinie können verschiedenen Batche², also Zellen, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten gesichert wurden oder unterschiedliche Zeiträume in Kultur verbracht haben, unterschiedliche Hypermutionsaktivität aufweisen, wie in Abbildung 8B für verschiedenen Batche der Raji-Zelllinie gezeigt ist.

Wegen der hohen Schwankungen zwischen verschiedenen Assays derselben Zelllinie wurden von verschiedenen Zelllinien Einzelzellklone (EZK) generiert (siehe Methodenteil). Diese unterschieden sich zum Teil deutlich in der Menge von AID-Protein wie in Abbildung 8C exemplarisch für BL100 gezeigt wird, und in 3.3.4 für Raji-EZK näher untersucht wurde. Die größere Uniformität von Einzelzellklonen im Vergleich mit Batchen einer Zelllinie ist mit einem reproduzierbaren Verhalten in Hypermutionsassays verbunden. Unabhängige Assays mit demselben EZK führen zu ähnlichen Verläufen der Graphen wie in Abbildung 8D für zwei verschiedene Raji-EZK dargestellt ist.

² Der Begriff *batch*, wird in dieser Arbeit verwendet um eine Charge einer Zelllinie zu beschreiben. Obwohl Zelllinien klonalen Ursprungs sind, weisen sie nach längeren Zeiträumen in Kultur eine gewisse Heterogenität auf, die in Experimenten zum Phänotyp einer Mischkultur führt mit Zellen, die auf gleiche Stimuli unter Umständen verschieden reagieren.

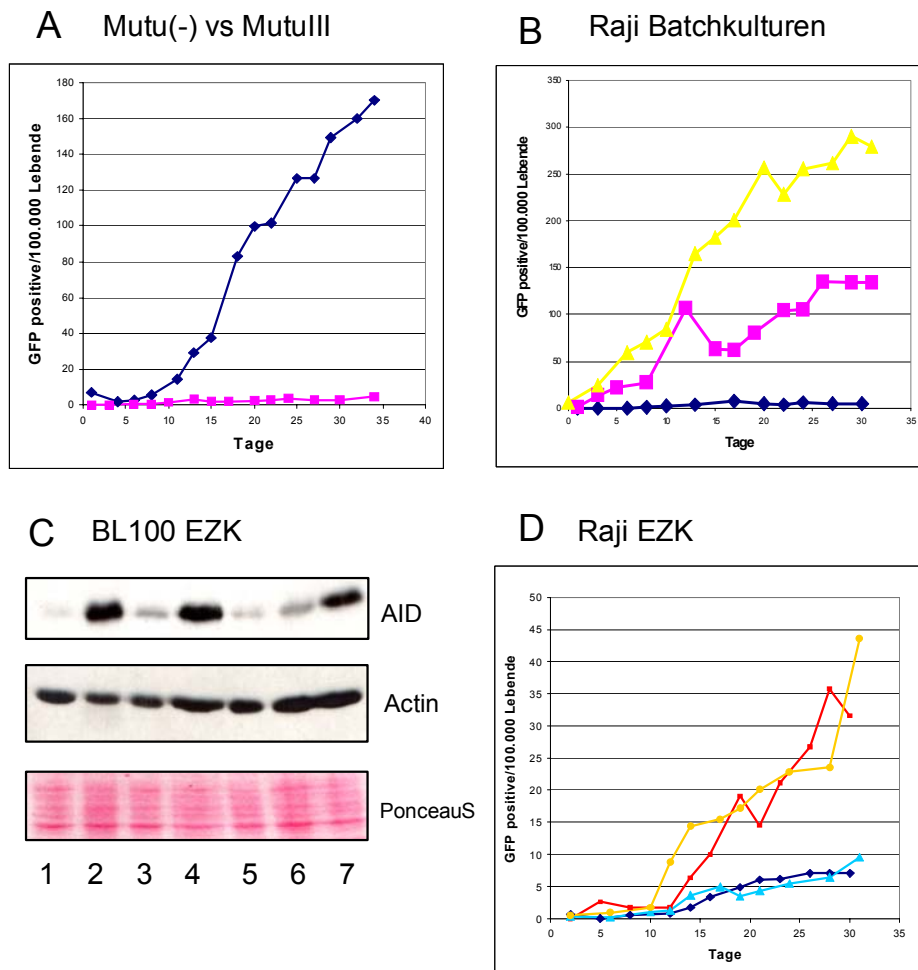


Abbildung 8: Hypermutationsaktivität in isogenen Zelllinien und Einzelzellklonen

A) Hypermutationsaktivität in MutuIII (rosa) versus Mutu(-) Zellen (blau). **B)** Hypermutationsaktivität verschiedener Batche von Raji-Zellen in unterschiedlichen Assays. **C)** Westernblot-Analyse der AID Level in verschiedenen BL100 Einzelzellklonen. Actin und PonceauS werden als Ladekontrolle gezeigt. **D)** Hypermutationsaktivität von Einzelzellklonen aus der Raji-Zelllinie. Die beiden Orange- bzw Blautöne sind Graphen unabhängiger Assays desselben Einzelzellklons.

3.1.4 Enhancereffekte in ausgewählten Zelllinien

Es gibt widersprüchliche Ergebnisse zu der Bedeutung von Enhancern für die Hypermutation im endogenen Locus und für Transgene (siehe Einleitung).

Um die Effekte von Enhancern in verschiedenen Zellen untersuchen zu können, wurden die Sequenzen des intronischen und 3'Enhancers aus dem Hypermutationsreporter entfernt (siehe 6.2.4) und parallele Transfektionen von Hypermutationsreportern mit und ohne Enhancer durchgeführt. In Abbildung 9 sind die Ergebnisse für die Enhancer-freien Konstrukte jeweils als hellere Farbtöne dargestellt. In den EBV-positiven Zelllinien Raji und BL60 zeigt sich ein positiver Effekt der Enhancer in jeweils zwei unabhängigen Versuchsdurchführungen. In Mutu(-) ist ebenfalls eine Erhöhung der SHM-Aktivität durch die Enhancer zu verzeichnen. Für die BL100-Zelllinie ist kein Unterschied in der SHM-Aktivität mit und ohne Enhancer sichtbar, allerdings ist die Hypermutationsaktivität im Vergleich mit den anderen Zelllinien und im Vergleich mit anderen Hypermutationsassays in BL100 gering.

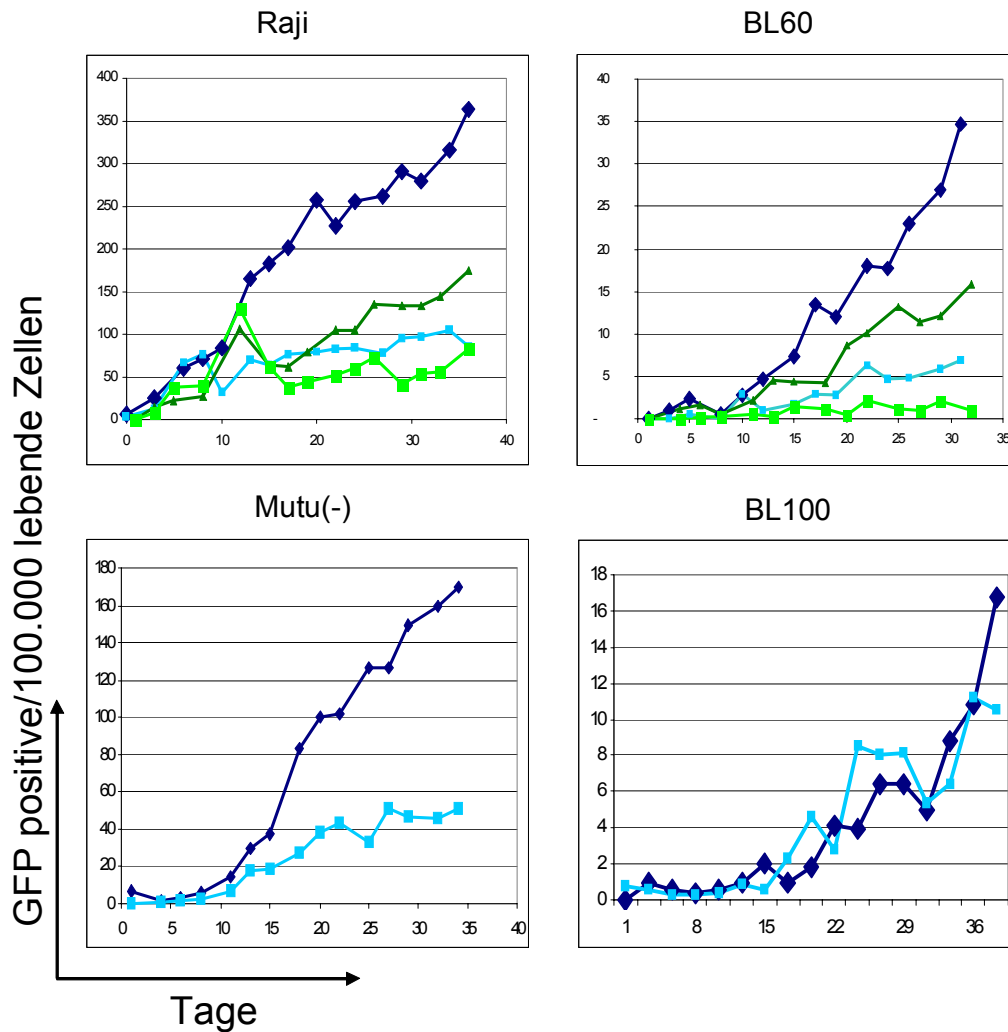


Abbildung 9: Enhancereffekte für ausgewählte Zelllinien

Dargestellt ist die Anzahl GFP positiver Zellen pro 100.000 Lebendzellen über einen Zeitraum von einem Monat. Der hellere Farbton wurde für den Vektor ohne Enhancer ausgewählt, der dunklere entspricht dem Vektor mit Enhancer. Unterschiedliche Farben stehen für unabhängige Assays in derselben Zelllinie

Der verbesserte Hypermutationsassay konnte somit angewendet werden, um die Effekte von Enhancern und die Heterogenität von Einzelzellklonen in Bezug auf die Hypermutationsaktivität darzustellen. Außerdem konnten verschiedene Zelllinien auf ihre SHM-Aktivität untersucht werden und stehen für weitere vergleichende Analysen zwischen hypermutierenden und nicht-hypermutierenden Zellen zur Verfügung

3.2 Vergleichende Analyse hypermutierender und nicht-hypermutierender B-Zelllinien

3.2.1 Vergleich auf phänotypischer Ebene

Es gibt nur einen Oberflächenmarker für die Unterscheidung von Zentroblasten und Zentrozyten im humanen Keimzentrum: CD77. Da somatische Hypermutation *in vivo* hauptsächlich in Zentroblasten stattfindet, wurde das Zelllinienset in einer FACS-Analyse auf die Oberflächenexpression von CD77 untersucht.

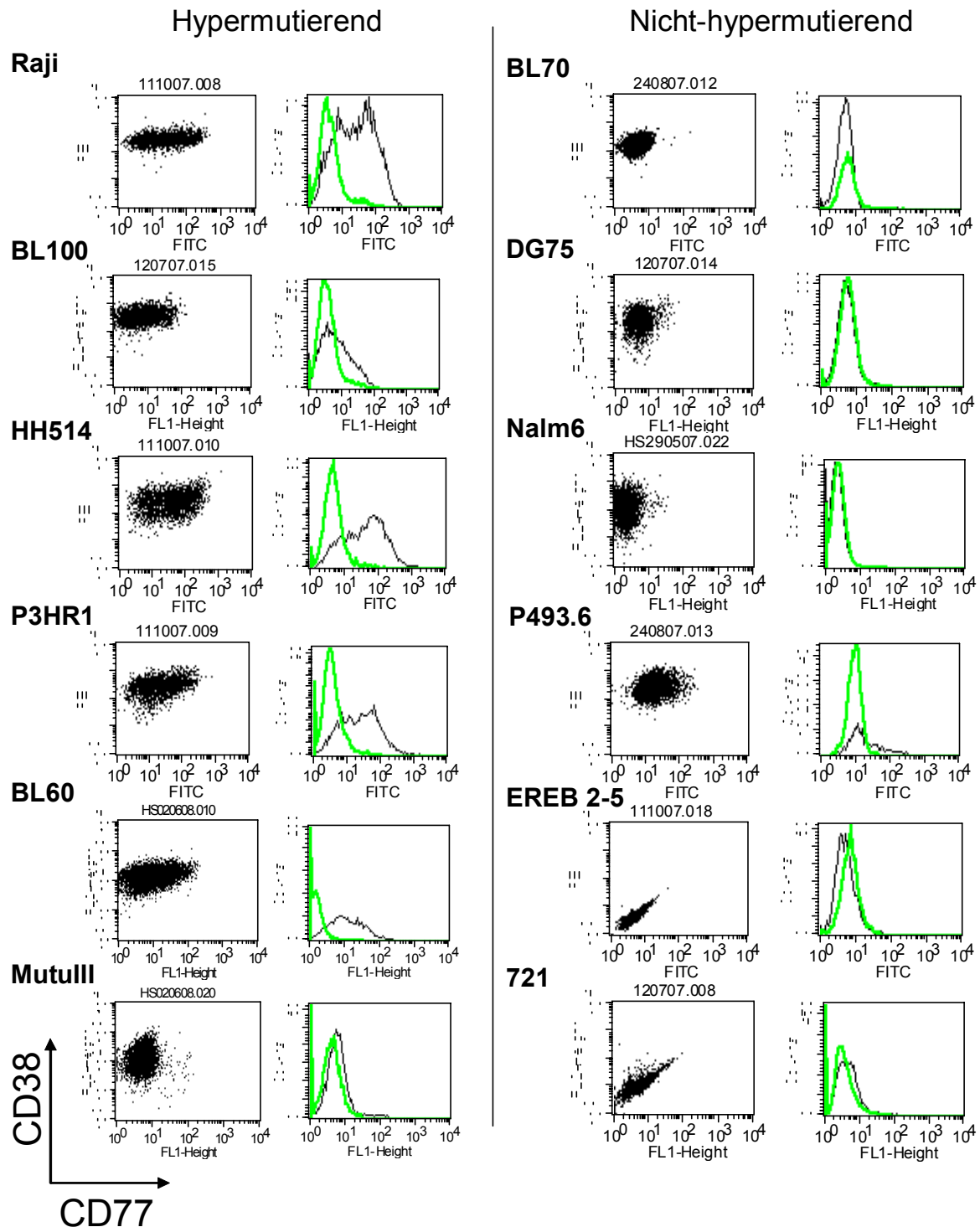


Abbildung 10: CD77/38 FACS-Färbung zur Ermittlung des Zentroblastenphänotyps

Die Zellen wurden mit Antikörpern gegen CD77 und CD38 gefärbt. Für den jeweiligen Zelltyp sind im linken Diagramm 20.000 lebende gefärbte Zellen ((Propidiumiodid (PI)-negative) und auf der rechten Seite ein Histogramm mit der Verteilung CD77-positiver Zellen in ungefärbten (grüner Graph) versus gefärbten Zellen (schwarzer Graph) dargestellt.

Die meisten der Zellen, die mittels des Hypermutterassays als hypermutierend eingestuft worden waren, wiesen einen Anteil CD77-positiver Zellen auf (siehe Abbildung 10). Nur MutuIII erscheint größtenteils CD77 negativ. Für Mutu(-) wurde kein Graph gezeigt, da eine ungefärbte Kontrolle für das Histogramm fehlte. Die Zellen weisen jedoch eine deutliche CD77-positive Subpopulation auf.

Von den nicht hypermutierenden Zellen zeigt nur P493.6 einen kleinen Anteil CD77-positiver Zellen, alle anderen sind CD77-negativ. Die Zelllinien EREB 2-5 und 721 sind außerdem CD38-negativ.

Die Präsenz CD77 positiver Zellen, die auch als Zentroblastenphänotyp bezeichnet werden kann, korreliert also relativ gut mit der Hypermutationsaktivität der Zelllinien, die untersucht wurden.

3.2.2 Vergleich auf Ebene der RNA-Expression

Um einen möglichen Einfluss von Keimzentrums-Transkriptionsfaktoren auf die Hypermutationsaktivität zu untersuchen wurde die Expression der Transkriptionsfaktoren bcl6, E2A (getrennt für die beiden Spleißvarianten E12 und E47), pax5 und c-myc in dem Zelllinienset analysiert. Zusätzlich wurde die Expression von AID als wichtigstem Hypermutationsfaktor ermittelt. Die IgM Expression in den Zellen wurde ebenfalls betrachtet, da Veränderungen im Transkriptionsspiegel der Immunglobulingene neben der Modulation der AID-Aktivität mögliche Ansatzpunkte für eine Regulation der Hypermutation durch Keimzentrums-Transkriptionsfaktoren darstellen.

Die quantitativen RT-PCR-Analysen wurden auf das Gen für das ribosomale Protein RBL23b normalisiert (siehe 6.4.3) und ergaben große Expressionsunterschiede innerhalb des Zellliniensets für alle untersuchten Faktoren (siehe Abbildung 11). Bcl6 ist in den hypermutierenden Zelllinien häufiger exprimiert (in sechs von sieben) als in den nicht hypermutierenden (drei von sieben), allerdings sind in dem nicht-hypermutierenden Set mit der Prä-B-Zelllinie Nalm6 und den *in vitro* immortalisierten EREB 2-5 und P493.6 auch Linien enthalten, die aufgrund ihres Differenzierungszustandes typischerweise noch kein bcl6 exprimieren. Die Expressionslevel korrelieren nicht mit der Hypermutationsaktivität.

Für die Präsenz von E12 und E47 zeigt sich kein klarer Unterschied zwischen hypermutierenden und nicht hypermutierenden Zelllinien. Lediglich die Expressionslevel von E47 sind in hypermutierenden Zellen im Schnitt etwas höher.

Die c-myc-Expression erscheint in den hypermutierenden Zelllinien mit Ausnahme von HH514 eher geringer als in den nicht-hypermutierenden, auch weisen die BL-Zelllinien innerhalb des gesamten Sets keine erhöhten c-myc-Level im Vergleich mit Zellen ohne die typische Translokation des Myc-Gens auf, wie zum Beispiel am Vergleich der Zelllinie BL100 mit den Zelllinien BJAB und Nalm6 deutlich wird.

Auch für die Expression von pax5 und IgM zeigt sich keine Korrelation mit der Hypermutationsaktivität der Zelllinien.

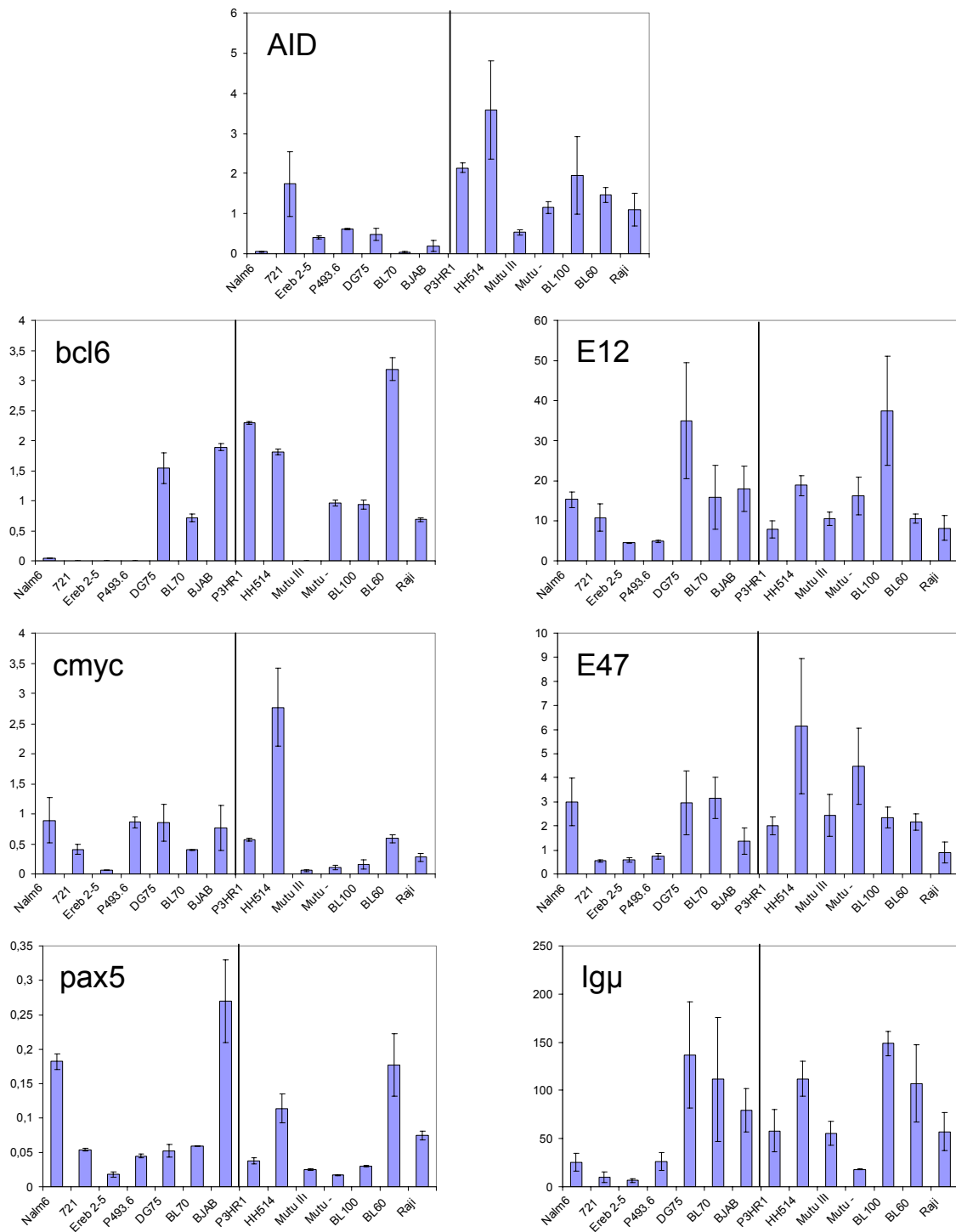


Abbildung 11: mRNA-Expressionsmengen von Keimzentersfaktoren im Zelllinienset

Quantitative RT-PCR-Analyse für die mRNA-Mengen von AID, bcl6, c-myc, pax5, E12, E47 und Igu. Die relativen mRNA-Mengen der verschiedenen Faktoren wurden auf die Expression von RBL23B normalisiert und jeweils für zwei unabhängige PCRs gemittelt. Links sind SHM-negative und rechts SHM-positive Zelllinien dargestellt.

Die AID-Expression dagegen ist in den hypermutierenden Zellen eindeutig höher als in den nicht-mutierenden Zelllinien und zeigt innerhalb der isogenen Zellsets P3HR1 und HH514 sowie MutuIII und Mutu(-) jeweils höhere Level in der stärker mutierenden Zelllinie. Allerdings zeigen auch nicht-hypermutierende Zelllinien eine deutliche AID-Expression.

Von allen untersuchten Faktoren ist damit auf RNA-Ebene die Expression von AID am ehesten mit der Hypermutationsaktivität der entsprechenden Zelllinien korreliert.

3.2.3 Vergleich auf Ebene der Proteinexpression

Da für die Aktivität von Transkriptionsfaktoren, oder auch AID, die vorhandene Proteinmenge bessere Hinweise gibt als die RNA Expressionslevel, wurde im Anschluss eine Westernblot-Analyse für AID und die Transkriptionsfaktoren durchgeführt und in Abbildung 12 zusammengefasst.

Wie schon auf RNA-Ebene zeigen die meisten Faktoren abgesehen von Pax5 auch auf Proteinebene stark ausgeprägte Expressionsunterschiede.

Für Bcl6 spiegeln die Proteinlevel recht gut die Unterschiede in den nachgewiesenen mRNA-Mengen wider. Die Interpretation der E2A Proteinmengen ist im Vergleich mit der RNA Expression dadurch erschwert, dass der verwendete Antikörper beide Splicingvarianten detektiert. Da jedoch die mRNA-Mengen für E12 deutlich höher sind als für E47 (siehe Abbildung 11) ermöglicht ein Vergleich mit den E12-Mengen eine gute Abschätzung. Es fällt auf, dass die graduellen Unterschiede der mRNA-Mengen auf Proteinebene zu wesentlich drastischeren Ungleichheiten führen. So weisen die drei Zelllinien 721, EREB 2-5 und P493.6 zwar niedrige, aber deutlich detektierbare Mengen von E12- (und E47-) mRNA auf. In der Westernblot-Analyse ist jedoch kein E2A-Protein nachweisbar. Ähnliches gilt für den Vergleich von P3HR1 und HH514, auch hier erscheinen die Abweichungen auf Proteinebene markanter als für die mRNA-Mengen. Insgesamt korrelieren die E2A-Proteinmengen nicht mit dem Hypermutationspotential der Zelllinien.

Die c-Myc-Proteinmengen korrelieren ebenfalls nicht mit der Hypermutationsaktivität der Zelllinien und entsprechen nur teilweise den ermittelten mRNA-Leveln. Hauptdeterminante für die c-Myc-Level scheint eher der EBV-Status beziehungsweise der Proliferationszustand der Zellen zu sein. Die drei Zelllinien mit den niedrigsten c-Myc Proteinmengen (EREB 2-5, 721 und MutuIII) proliferieren weitgehend unabhängig von c-Myc auf dem EBV-Wachstumsprogramm.

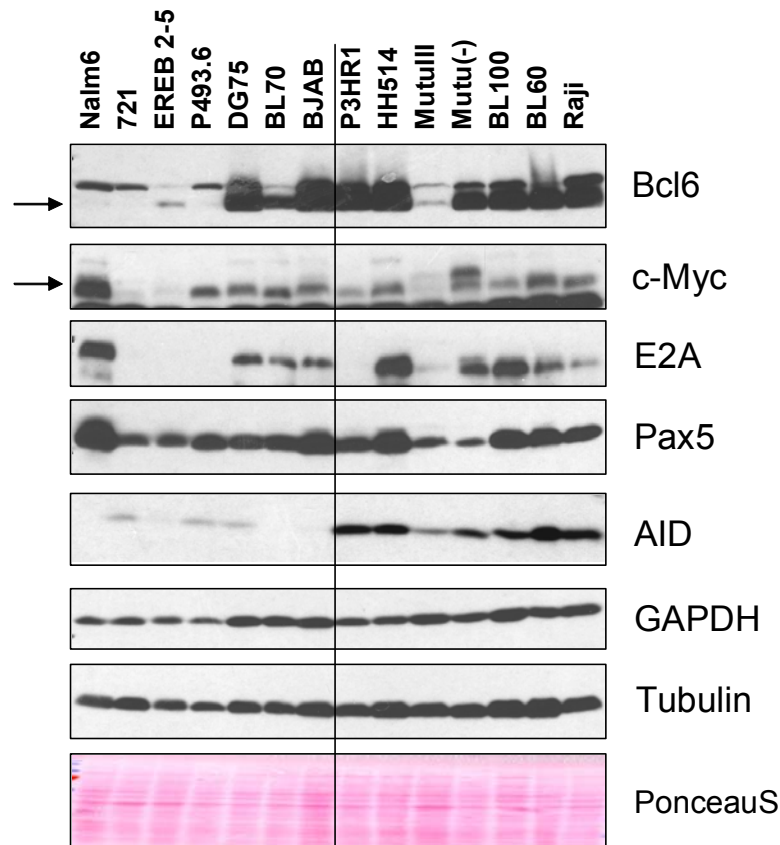


Abbildung 12: Proteinmengen für AID und die Transkriptionsfaktoren im Zelllinienset

Westernblot-Analyse der Proteinmengen für die Transkriptionsfaktoren und AID in den Zellen des Zellliniensets. Gleiche Proteinmengen wurden aufgetragen und zusätzlich über PonceauS sowie GAPDH und Tubulin als Ladekontrollen kontrolliert. Der Pfeil markiert die Bande mit der richtigen Höhe. Für Bcl6 trat in allen Versuchen mit diesem Antikörper eine unspezifische Bande oberhalb der richtigen Bande auf. Die zusätzliche Bande in der c-Myc Darstellung ist ein Signal der Tubulin-Bande, die vor c-Myc und mit demselben Zweitantikörper nachgewiesen wurde.

Pax5 setzt sich von den anderen Transkriptionsfaktoren dadurch ab, dass in diesem Fall die deutlichen Unterschiede der mRNA-Mengen zwischen den Zelllinien nicht zu größeren Abweichungen der Proteinmengen führen. Lediglich die niedrige Expression von Pax5 in beiden Mutu-Zelllinien unabhängig von ihrem EBV-Status ist interessant, da MutuIII für alle anderen TFs die Ausnahme innerhalb der hypermutierenden Zelllinien darstellt. Eine Korrelation von Pax5 mit der Hypermutationsaktivität der Zelllinien ist nicht zu erkennen.

Für AID bestätigen die Proteindaten die Annahme einer Korrelation zwischen AID-Menge und SHM. Zwar weisen auch nicht-hypermutierende Zelllinien geringe Mengen AID-Protein auf, diese sind allerdings in hypermutierenden Zelllinien deutlich höher.

Zusammenfassend korreliert also auch auf Proteinebene die Menge von AID am ehesten mit dem Hypermutationspotential der Zellen.

3.3 Etablierung der Überexpression von Keimzentrums-transkriptionsfaktoren

3.3.1 Klonierung der Überexpressionsvektoren

Für die Überexpression der Keimzentrumstranskriptionsfaktoren wurde ein induzierbares Vektorsystem, basierend auf dem pRTS1 Plasmid (Bornkamm et al., 2005), verwendet. Die Plasmide verfügen über einen bidirektionalen Tetrazyklin-regulierbaren Promotor, wodurch eine induzierbare Expression des *gene-of-interest* (GOI) zusammen mit der Expression eines *ngfr*-Gens möglich ist (siehe Abbildung 13). Dieses kodiert für eine verkürzte, inaktive Form des Transmembranproteins NGFR (*nerve growth factor receptor*), das durch eine FACS-Färbung nachweisbar ist. Die Induktion kann statt mit Tetrazyklin (Tet) auch mit dem weniger toxischen Analogon Doxyzyklin (Dox) erfolgen.

Da das Vektorsystem genau wie der Hypermutationsreporter eine Hygromycinresistenz aufwies, wurde er umklontiert und das entsprechende Gen durch ein Puromycinresistenzgen ersetzt. Dieser Vektor diente dann als Ausgangspunkt für Überexpressionsplasmide für die Transkriptionsfaktoren Bcl6, E2A, Pax5, c-Myc sowie für Luciferase (LUC) als Negativkontrolle und AID als Positivkontrolle.

Für Luciferase, AID und c-Myc konnten Inserts aus vorhandenen Vektoren verwendet werden. Für Bcl6, E2A und Pax5 wurde per PCR ein vollständiges Transkript aus cDNA gewonnen, mit Schnittstellen versehen und entweder direkt in den Überexpressionsvektor, oder zunächst in einen Zwischenvektor kloniert. Da bei der Überprüfung der Sequenzen alle PCR-Produkte Mutationen aufwiesen, mussten jeweils mehrere Fragmente über weitere Klonierungsschnitte kombiniert werden um einen korrekten Überexpressionsvektor zu erhalten (Details finden sich im Methodenteil).

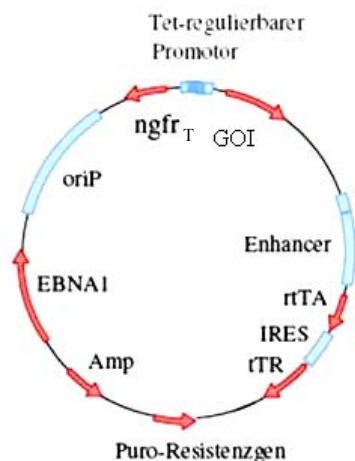


Abbildung 13: Ausgangsvektor für die Überexpression der Transkriptionsfaktoren

GOI (*gene of interest*); Amp: Ampicillin (Selektion in Bakterien); IRES: *internal ribosomal entry site*; ngfr: trunkierter *nerve growth factor receptor*; oriP: *origin of latent replication*; Puro: Puromycin (Selektion in B-Zellen); rTA: *reverse tetracycline-controlled transactivator*; tTR: *tetracycline-controlled transrepressor*

3.3.2 Test der Vektoren in verschiedenen Zelllinien

Um die Funktionalität der Vektoren zu testen, wurde nach Abschluß der Klonierung jeder der Vektoren in mindestens zwei verschiedene Zelllinien überexprimiert. Nach Induktion und Selektion wurden die ngfr-positiven Zellen über eine MACS-Säule angereichert und in einer Western-Blot Analyse untersucht (siehe Abbildung 14). Die Anreicherung war notwendig, weil in einigen Zelllinien die Selektion nicht vollständig durchgeführt werden konnte.

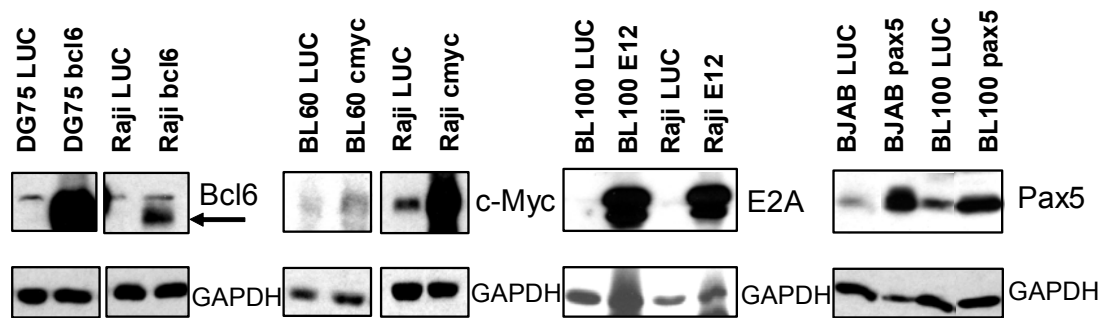


Abbildung 14: Test der Überexpressionsvektoren für Bcl6, c-Myc, E12 und Pax5

Die verschiedenen Zelllinien wurden zunächst mit den Überexpressionsvektoren bzw. einer Luciferasekontrolle transfiziert, am nächsten Tag induziert und unter Selektion gesetzt. Nach 5-12 Tagen wurden die Zellen mittels FACS geprüft, die ngfr-positiven Zellen über MACS-Säulen isoliert und zu Proteinextrakten verarbeitet. In der Westernblot-Analyse wurde die Überexpression mit dem jeweiligen Antikörper nachgewiesen und GAPDH als Ladekontrolle analysiert.

Alle Überexpressionsvektoren führen zu einem deutlichen Anstieg des entsprechenden Proteins. Der Grad der Überexpression, bzw. der Anreicherung des Proteins variiert zwischen den einzelnen Faktoren. So ist endogenes Bcl6 im Vergleich mit dem überexprimierten praktisch nicht nachweisbar, Pax5 wird moderat überexprimiert und c-Myc ist in einer der zwei getesteten Zelllinien (BL60) nur schwach überexprimiert. Da alle TFs durch denselben Vektor überexprimiert werden, kann dies mögliche Hinweise auf die Regulation der Transkriptionsfaktoren selbst liefern.³

3.3.3 Etablierung von überexprimierenden Einzelzellklonen

Nachdem bereits bei den Hypermutationsassays in verschiedenen Zelllinien die hohe Varianz im Verlauf von Assays zwischen Batchen derselben Zelllinien aufgefallen war, wohingegen Einzelzellklone eine höhere Reproduzierbarkeit aufwiesen, lag es nah auch die Überexpression in EZKs durchzuführen. Dies ist auch angesichts der hohen Expressionsvariabilität von Klonen einer Zelllinie eine Möglichkeit schon vor den Experimenten eine Charakterisierung der Klone vorzunehmen. Die Überexpression erfolgt

³ Für E2A war eine massive Überexpression des Proteins nach Transfektion mit dem klonierten E12-Überexpressionsvektor sichtbar. Nachträgliche Analysen des Vektors nach Abschluss der Arbeit ergaben mehrere Mutationen in der Sequenz, die zum Verlust der Funktionalität des Proteins geführt haben könnten. Dies könnte auch für die Regulation des Proteins durch Degradation gelten.

mit dem beschriebenen, auf dem pRTS1-System basierenden induzierbaren Vektor, in dem die Charakterisierung der basalen Expression vor Induktion gut durchgeführt werden kann.

Allerdings ist das Generieren von Einzelzellklonen relativ aufwändig, so dass eine Beschränkung auf eine Zelllinie erfolgen musste. Die Raji-Zelllinie wurde hierfür ausgewählt, weil sie im Labor gut etabliert ist und eine robuste Hypermutationsaktivität zeigt, die es ermöglicht Modulationen sowohl nach oben als auch nach unten zu detektieren.

3.3.4 Charakterisierung der Einzelzellklone

In Tabelle 2 sind die Tests der Raji-Überexpressionseinzellklone zusammengefasst.

Für die TF wurden verschieden viele Klone generiert, auf Induzierbarkeit getestet und bis zur weiteren Verwendung gesichert. Von diesen konnten nicht alle, aber doch die meisten, wieder aufgetaut werden (44 von 47). Bei anschließender Prüfung der Induzierbarkeit von ngfr-Oberflächenexpression durch Doxycyclinzugabe waren immerhin über 80% der aufgetauten Klone induzierbar. Zumindest in zwei Fällen war jedoch bei Westernblot-Analysen der Überexpression trotz ngfr-Induktion kein Effekt auf Proteinebene nachweisbar.

Insgesamt war es möglich für alle TF zwei bis drei Überexpressionsklone für die weiteren Untersuchungen zu identifizieren. Für diese Auswahl der EZK wurden die basalen Proteinlevel der Transkriptionsfaktoren und von AID ermittelt, sowie die Induktion des auf dem Überexpressionsvektor kodierten Proteins durch Westernblot-Analyse bestätigt.

Tabelle 2: Zusammenfassung der Generierung von Überexpressions-Einzelzellklonen

Faktor	reaktivierbar	induzierbar (ngfr)	induzierbar (Protein)	verfügbar	verwendet
Bcl6	4 (5)	4 (4)	2 (3)	2	2
c-Myc	9 (10)	8 (9)	3 (4)	3	2
E2A	9 (9)	6 (9)	3 (3)	3	3
Pax5	10 (11)	8 (10)	3 (3)	3	3
LUC	12 (12)	10 (12)	/	10	3
Total	44 (47)	36 (44)	11 (13)		

Für jeden der zu überexprimierenden Faktoren (Spalte 1) ist die Zahl der reaktivierbaren Klone, die nach der initialen Induktionstest eingefroren worden waren, von der Gesamtzahl generierter Klone angegeben (Spalte 2). Diese wurden zunächst durch Zugabe von Doxycyclin für mindestens 48 Stunden auf Induzierbarkeit getestet, was durch eine FACS-Färbung ermittelt werden konnte (Ergebnisse in Spalte 3). Als induzierbar wurden Klone mit mehr als 5% ngfr-positiven Zellen definiert. Im Durchschnitt waren in induzierbaren Klonen 35% der lebenden Zellen ngfr-positiv. Von diesen Klonen wurden einige zusätzlich mittels einer Westernblot-Analyse auf Induktion des Proteins getestet (Spalte 4), bevor sie für weitere Experimente verwendet wurden.

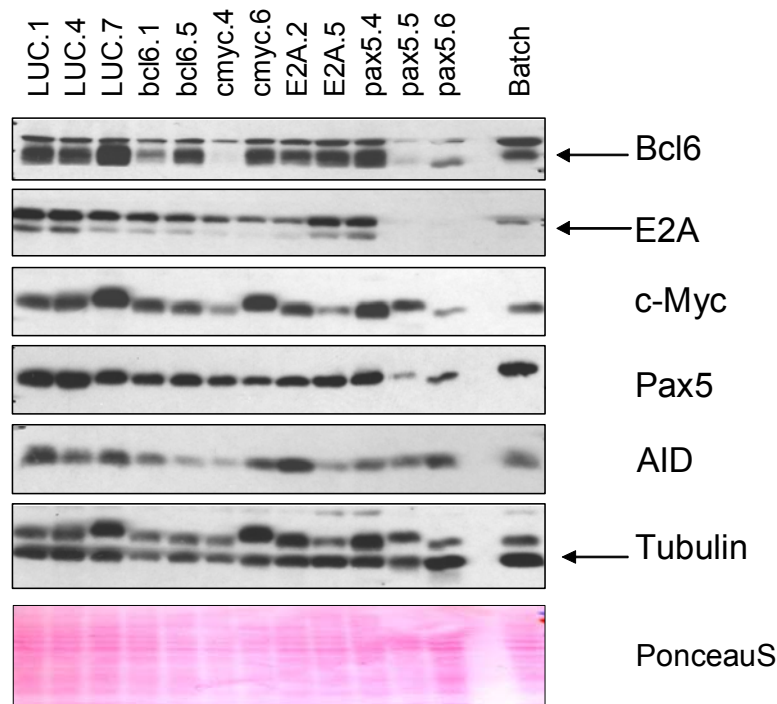


Abbildung 15: Charakterisierung der verwendeten Raji-Überexpressionsklone

Western-Blot Analyse der basalen Proteinmengen der Transkriptionsfaktoren und AID in den generierten Einzelzellklonen der Raji-Zelllinie, die Vektoren zur Überexpression von Luciferase, Bcl6, c-Myc, E2A und Pax5 aufweisen. Auf dem Blot für Bcl6 ist eine unspezifische Bande oberhalb der Bande von Bcl6 sichtbar. Bei dem E2A Blot tritt in Klonen mit einer hohen E2A-Expression eine unspezifische Bande unterhalb der richtigen Bande auf. Eine zweite Band für Tubulin ist, wie auch an den Intensitätsunterschieden und Höhenschwankungen zu erkennen, ein Durchstrahlen der zuvor mit demselben Zweitantikörper entwickelten c-Myc-Bande

Wie in Abbildung 15 zu sehen zeigt sich wie schon für AID in der hypermutierenden Zelllinie BL100 demonstriert (siehe Abbildung 8) eine hohe Expressionheterogenität für die untersuchten Proteine zwischen Einzelzellklonen aus demselben Batch. So weisen die Klone Cmyc.4 und Pax5.5 fast kein nachweisbares Bcl6 auf. Die Proteinmengen in den Einzelzellklonen variieren dabei um die im Batch nachweisbaren Level. Für E2A sind die Abweichungen insgesamt geringer. Die meisten Klone weisen jedoch höhere Mengen von E2A-Protein auf als der Ursprungsbatch. Interessanterweise ist in zwei der Pax-überexprimierenden Klone fast kein E2A nachweisbar. Um systematische Effekte dieser niedrigen E2A-Expression in den Experimenten mit Pax5-Überexpression auszuschließen wurde deshalb - wenn möglich - der dritte Klon Pax5.4 vergleichend herangezogen.

Die Proteinlevel für c-Myc schwanken ebenfalls deutlich, noch auffälliger sind jedoch die Schwankungen in der Höhe der entsprechenden Bande. Dies ist kein technisches Problem wie Wiederholungen des Blots, Ponceaufärbung und Bandenverlauf direkt ober- und unterhalb der Höhe der c-Myc Bande zeigen. Da die c-Myc-Bandenhöhe für einen EZK auch in unabhängig genommenen Pellets reproduzierbar ist (siehe Abbildung 16), handelt es sich vielmehr um Zellklon-spezifische Unterschiede im c-Myc-Protein, beispielsweise durch posttranskriptionelle Modifikationen oder durch Mutationen. Es ist bemerkenswert, dass die

Bande im Batch nicht als sehr breite oder als Doppelbande erscheint, andererseits macht die Präsenz von c-Myc-Proteinen mit abweichendem Laufverhalten keine Aussage über das normale Verhältnis solcher Varianten in der Batchkultur.

Wie schon im Vergleich verschiedener Zelllinien zeigt Pax5 auch beim Vergleich von Klonen derselben Zelllinie keine ausgeprägten Schwankungen der Proteinlevel.

Die Mengen des AID-Proteins als zentralem Hypermutationsfaktor unterscheiden sich deutlich zwischen den einzelnen Klonen. Dies korreliert nicht mit den Schwankungen in der Proteinexpression eines der Transkriptionsfaktoren, so dass die AID-Level nicht als direkte Folge der Basallevel eines der Transkriptionsfaktoren in den verschiedenen Überexpressionsklonen erscheinen.

Um die Induzierbarkeit der Proteinexpression zu testen und einen Eindruck von der maximalen Induktionsstärke in Kultur zu erhalten, wurden die Klone fünf Tage lang mit Doxycyclin (Dox) induziert und eine Westernblot-Analyse dieser Zellen im Vergleich mit uninduzierten Zellen durchgeführt. Die in Abbildung 16 dargestellte Westernblot-Analyse zeigt, dass alle Transkriptionsfaktoren deutlich überexprimiert werden konnten.

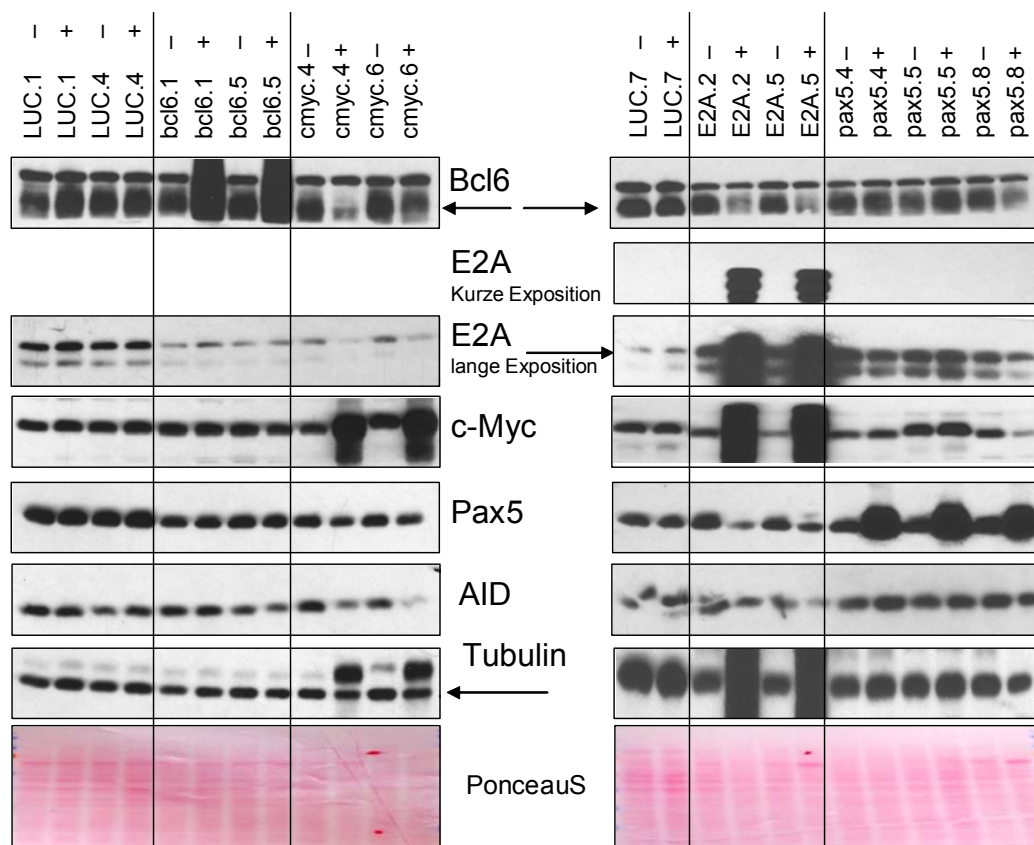


Abbildung 16: Induktion von Transkriptionsfaktoren in Raji-Einzelzellklonen:

Westernblot-Analyse von Raji-Einzelzellklonen auf Überexpression: „-“ sind uninduzierte Zellen, „+“ sind Zellen, die für fünf Tage mit Doxycyclin induziert und auf die Transkriptionsfaktoren Bcl6, E2A, c-Myc und Pax5 untersucht wurden. Zusätzlich wurde auf AID getestet und Tubulin als Ladekontrolle entwickelt. Durchstrahlende Banden, insbesondere der E2A-überexprimierenden Proben sind auch bei der Entwicklung anderer Antikörper mit gleichem Zweitantikörper (gilt hier für Tubulin und c-Myc) sichtbar, deshalb wurde die korrekte Bande jeweils mit einem Pfeil gekennzeichnet.

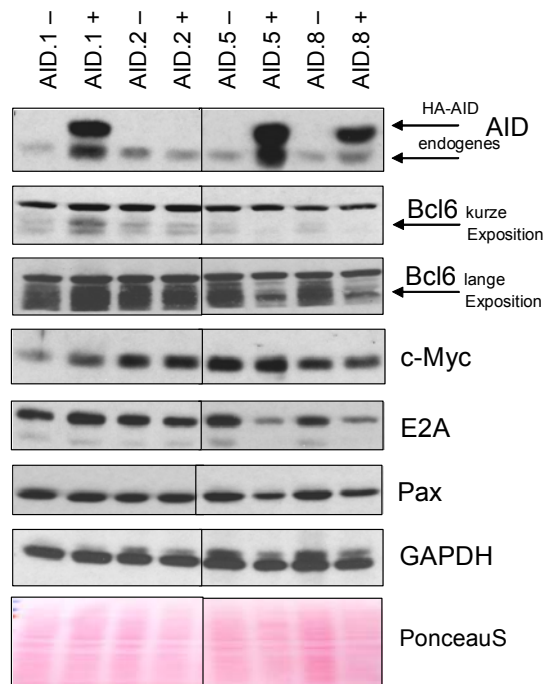


Abbildung 17: AID-Überexpression in Raji-Einzelzellklonen

Die Klone wurden fünf Tage mit Doxycyclin induziert, anschließend geerntet und zum Vergleich zusammen mit Extrakten von uninduzierten, aber ansonsten gleich behandelten Zellen auf ein Gel aufgetragen. Der Westernblot wurde auf die Expression der Transkriptionsfaktoren Bcl6, c-Myc, E2A und Pax5 sowie AID untersucht. GAPDH und PonceauS dienen als Ladekontrolle.

Da im weiteren Verlauf der Arbeit eine Positivkontrolle für AID-Effekte benötigt wurde, wurden zusätzlich zu den hier bereits vorgestellten Einzelzellklonen weitere Einzelzellklone generiert, die im selben Vektorhintergrund HA-AID exprimieren, also AID, das mit einer Haemagglutinin (HA)-Markerstruktur versehen wurde. Dieses ist trotz des zusätzlichen Markers funktional, erscheint im Blot jedoch als eine Bande oberhalb des endogenen AID. Auch hier wurden drei induzierbare Klone identifiziert (siehe Abbildung 17). Der Klon AID.2 war nicht induzierbar. Interessanterweise scheint es in den Einzelzellklonen AID.5 und AID.8 so, als würde die Überexpression von AID einen negativen Einfluss auf die Expression von E2A und Bcl6 haben. Der Effekt ist jedoch nicht konsistent, da die Proteinmengen in Klon AID.1 nach Induktion nicht sanken.

3.4 Auswirkungen der Überexpression der Transkriptionsfaktoren auf AID

3.4.1 Überexpression der Transkriptionsfaktoren in verschiedenen Zelllinien

Einzelzellklone stellen ein gutes experimentelles System dar um durch Kontrolle von Parametern wie Basallevel der untersuchten Faktoren auch kleine Effekte zu detektieren. Allerdings ist ihre Aussagekraft über die Allgemeingültigkeit von nachgewiesenen Effekten

beschränkt. Daher wurden in einem ersten Schritt die Transkriptionsfaktoren in verschiedenen Zelllinien überexprimiert und auf Effekte untersucht, die zelllinienunabhängig auftraten. Dazu wurden die Zelllinien mit den Überexpressionsvektoren transfiziert. Im Gegensatz zu den Experimenten, die die Funktionalität der Vektoren testen sollten, wurden die Zellen jedoch nicht unter Selektion gesetzt, sondern nach vier Tagen bereits geerntet. Damit sollte ein Zeitfenster zur Detektion transienter und langfristiger Effekte erreicht werden. Die Zellen wurden einen Tag nach der Transfektion induziert und nach vier Tagen eine MACS-Aufreinigung der ngrf-positiven Zellen durchgeführt. Anschließend wurden für die Zelllinien die Eluate für alle Transkriptionsfaktoren einer Westernblot-Analyse unterzogen.

Die Überexpression der verschiedenen Faktoren fiel sehr unterschiedlich stark aus. Für E2A ist sie so stark, dass das Signal in allen folgenden Expositionen wieder auftritt. Auch die Überexpression des Pax-Proteins liegt weit über den endogenen Proteinleveln. Für Bcl6 ist nur in der Zelllinie BL100 die Bcl6-Überexpression nachweisbar, da die Blots der anderen Zelllinien auch bei maximaler Exposition keine Bcl6-Signale zeigten.

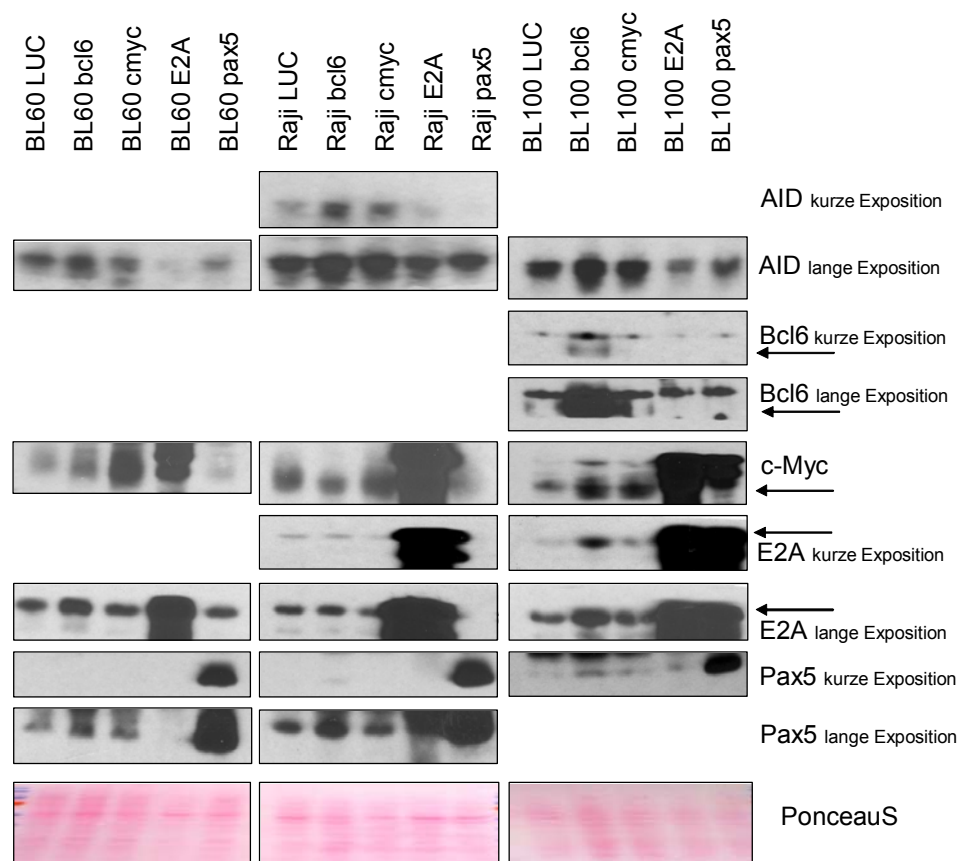


Abbildung 18: Überexpression der Transkriptionsfaktoren in Batchkulturen verschiedener Zelllinien

$1,5-2 \times 10^7$ Zellen wurden mit dem Überexpressionsvektor transfiziert und am nächsten Tag induziert. Am vierten Tag wurden die ngrf-positiven Zellen isoliert und für die verschiedenen Transkriptionsfaktoren und Luciferase als Negativkontrolle per Westernblot-Analyse auf die Expression der Transkriptionsfaktoren und AID untersucht. Für E2A ist das Signal so stark, dass es auch in der darauffolgenden Entwicklung von c-Myc mit demselben Zweitantikörper deutlich zu sehen ist. PonceauS dient als Ladekontrolle.

Wie bereits bei der Etablierung der Überexpressionsvektoren gesehen, ist auch in diesem Experiment die c-Myc Überexpression eher schwach, wenn auch zumindest in BL60 definitiv vorhanden.

In allen drei untersuchten Zelllinien zeigt sich ein erhöhtes AID-Signal bei der Probe für Bcl6-Überexpression. Nur bei BL100 kann es sich dabei möglicherweise um einen Effekt von Ladungsunterschieden handeln. Auch für die Überexpression von c-Myc ist ein leichter positiver Effekt auf AID zu erkennen. E2A und Pax5-Überexpressionen hatten keinen positiven, sondern allenfalls einen negativen Effekt auf die Proteinmenge von AID. Es erscheint jedoch problematisch, dass genau die Transkriptionsfaktoren einen Effekt auf AID zeigen, deren Überexpression als weniger gesichert angesehen werden muß.

Wie man anhand von Tabelle 3 entnehmen kann ist das Potential des hier verwendeten experimentellen Ansatzes weitgehend ausgeschöpft. Der Anteil ngfr-positiver Zellen ist angesichts der in diesen Zellen zu erwartenden Transfektionseffizienzen und Anteilen induzierbarer Zellen relativ hoch und die Ausbeute erreicht Spitzenwerte von über 90%. Trotzdem ist die Zahl der Zellen die für die Analysen zur Verfügung stehen, deutlich geringer als man sie normalerweise für Westernblot-Analysen anstrebt (etwa 3×10^6 als Mindestmenge). Es bleiben zwei grundsätzliche Möglichkeiten: entweder eine Veränderung

Tabelle 3: Effizienz der MACS-Aufreinigung für die Überexpression in Batchkulturen

Zelllinie und über-exprimierter TK	% ngfr positive Zellen vor MACS	% ngfr positive Zellen in Durchlauf / Eluat	Zellzahl Eluat	Ausbeute
BL60 LUC	8,9	0,2 / 70,5	$2,1 \times 10^6$	93%
BL60 bcl6	14,6	1,0 / 85,6	$3,1 \times 10^6$	84%
BL60 cmyc	10,9	0,4 / 75,9	$1,5 \times 10^6$	56%
BL60 E2A	7,5	0,1 / 55,2	$0,6 \times 10^6$	32%
BL60 pax5	13,2	0,4 / 71,9	$1,1 \times 10^6$	34%
Raji LUC	3,9	0,1 / 57,9	$0,8 \times 10^6$	55%
Raji bcl6	9,8	0,3 / 81,0	$1,1 \times 10^6$	31%
Raji cmyc	6,5	0,3 / 74,5	$1,0 \times 10^6$	42%
Raji E2A	6,4	0,1 / 72,5	$1,3 \times 10^6$	56%
Raji pax5	6,7	0,3 / 65,3	$2,1 \times 10^6$	89%
BL100 LUC	15,7	3,9 / 88,7	$5,8 \times 10^6$	95%
BL100 bcl6	18,0	6,6 / 93,0	$6,0 \times 10^6$	93%
BL100 cmyc	16,9	2,5 / 86,3	$5,9 \times 10^6$	97%
BL100 E2A	19,3	2,3 / 88,0	$5,8 \times 10^6$	86%
BL100 pax5	19,6	4,9 / 93,3	$6,0 \times 10^6$	87%

Die Tabelle gibt die wichtigsten Parameter für die durchgeführte MACS-Aufreinigung wieder. Die ngfr-Daten wurden am Tag der Aufreinigung für alle Proben erhoben. Für die Berechnung der Ausbeute wurde für jede Zelllinie exemplarisch eine Ausgangskultur gezählt und deren Dichte ergab zusammen mit dem gemessenen Anteil ngfr-positiver Zahlen die maximale Ausbeute, deren tatsächlich isolierter Anteil die Eluate darstellen. Die Zellen im Eluat wurden auf zwei Pellets verteilt und das größere der beiden für die Westernblots verwendet.

des experimentellen Systems zum Beispiel durch Selektion auf vektor-tragende Zellen und damit Erhöhung des Anteils der ngfr-positiven Zellen, oder Nutzung eines experimentellen Ansatzes mit besseren Ausgangsparametern. Hierfür bieten sich die generierten Einzelzellklone an. Diese tragen bereits alle den Überexpressionsvektor, der durch Zugabe von Doxycyclin die Überexpression induzieren kann.

Darum wurden ausgehend vom potentiellen positiven Effekt der Bcl6 und c-Myc Überexpression auf AID weitere Untersuchungen in den überexprimierenden Einzelzellklonen der Raji-Zelllinie durchgeführt.

3.4.2 Überexpression der Transkriptionsfaktoren in titrierten Induktionen

Für die Analyse möglicher Überexpressionseffekte in Raji-Einzelzellklonen wurden diese mit verschiedenen Mengen Doxycyclin behandelt und nach zwei Tagen (für Kurzzeiteffekte) und nach fünf Tagen (für Langzeiteffekte) Pellets für eine Untersuchung auf Protein- und RNA-Ebene unternommen. Dies wurde als Erstes exemplarisch an c-Myc überexprimierenden Klonen getestet.

Wie aus Abbildung 19 ersichtlich ist, zeigt sich eine Induktion von c-Myc-Protein nach zwei Tagen bereits ab einer Zugabe von 10ng/ml Doxycyclin. Obwohl an Tag fünf die c-myc-mRNA Level sich noch weiter erhöht haben, spiegelt sich dies in der Westernblot-Analyse nicht wider. Insgesamt zeigt der EZK eine zeit- und Dox-Mengen-abhängige kontinuierliche Induktion. Allerdings zeigen sich keine Effekte auf AID, weder auf Protein, noch auf mRNA-Ebene (nicht gezeigt).

Ein Grund dafür, dass sich der Effekt auf AID, der in Analysen von Batchkulturen aufgetreten war, hier nicht zeigt, könnte in der unvollständigen Induzierbarkeit der Klone liegen. Obwohl die Klone dauerhaft in Selektionsmedium kultiviert werden, zeigen FACS-Analysen einen unterschiedlichen Grad an Zellen, die nach Dox-Zugabe ngfr auf der Oberfläche exprimieren. Deshalb erschien es sinnvoll auch in den Einzelzellklonen ähnlich wie in den Überexpressionsanalysen in den verschiedenen Zelllinien eine MACS-Strategie zu verwenden um Effekte in tatsächlich überexprimierenden Zellen sichtbar zu machen.

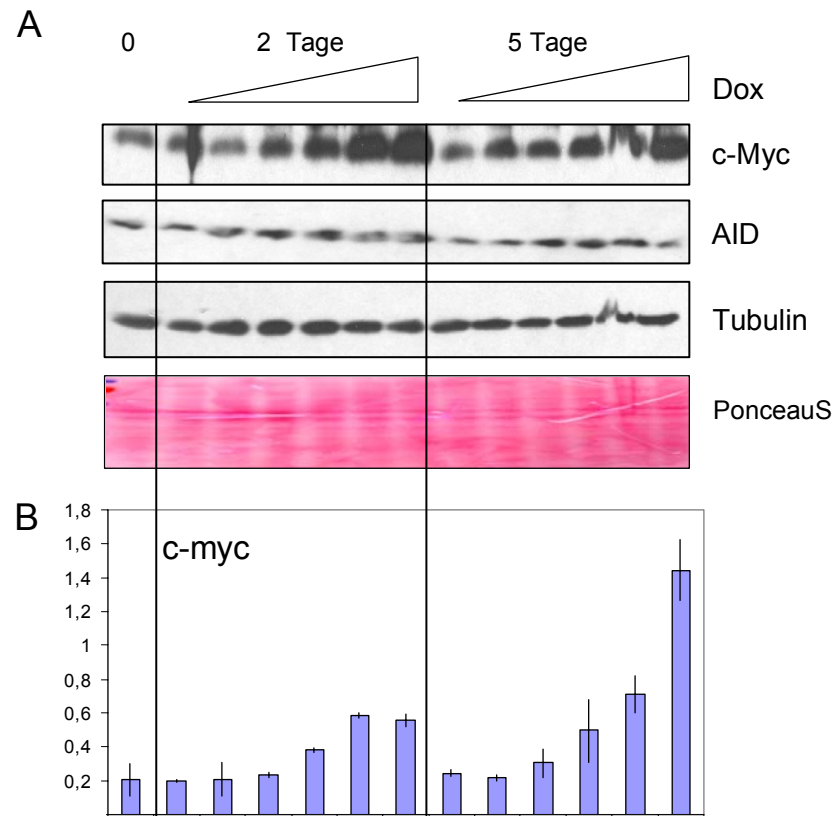


Abbildung 19: c-Myc-Überexpression nach zwei bis fünf Tagen Induktion mit Doxycyclin

Die Zellen wurden am Tag vor Beginn des Experiments auf eine Dichte von 3×10^5 Zellen/ml eingestellt. An Tag 0 wurden Proben für Protein- und RNA-Analyse entnommen, die Kultur aufgeteilt und mit 0, 2, 10, 50, 250 und 1000 ng/ml Doxycyclin behandelt. Nach zwei und fünf Tagen wurden Proben entnommen. **A)** Es wurde eine Westernblot-Analyse für c-Myc und AID durchgeführt. Tubulin und Ponceau S dienen als Ladekontrolle.

B) Eine quantitative RT-PCR-Analyse der mRNA-Mengen von c-myc wurde durchgeführt und ist hier auf die mRNA-Mengen des ribosomalen Proteins RBL23 normalisiert dargestellt.

3.4.3 Untersuchung der Überexpression mittels MACS-Strategie

Um ein möglichst sauberes experimentelles System für den Nachweis von Überexpressionseffekten der Transkriptionsfaktoren auf AID zu nutzen, sollten die den überexprimierenden Zellen ähnlichsten Zellen als Vergleichspopulation dienen. Wie bei der Charakterisierung der Einzelzellklone (siehe Abbildung 15) bereits beschrieben variieren die AID-Level zwischen Einzelzellklonen beträchtlich. Daher sollte nach der Induktion eine Trennung der Zellen in induzierte und nichtinduzierte vorgenommen werden, was mittels einer Aufreinigung ngfr-positiver und -negativer Zellen möglich ist.

Mit einem zweistufigen Verfahren (Details siehe 6.1.8) konnten von Ausgangspopulationen mit 9 bis 63% ngfr-positiven Zellen Fraktionen mit einem Anreicherungsfaktor von 5 bis 50 fach erreicht werden. Ein Beispiel ist in Abbildung 20 A gezeigt.

3.4.4 Induktion von Protein durch Überexpression in Einzelzellklonen

Das Verfahren der zweistufigen MACS-Reinigung wurde auf die Überexpressions-Einzelzellklone der Raji-Zelllinie angewandt. Dazu wurden die Zellen mit zwei verschiedenen Doxycyclin-Konzentrationen, nämlich 40 und 200ng/ml induziert. In den Versuchen mit Titrationen von Doxycyclin in c-Myc-überexprimierenden EZK war bereits die niedrigere Menge ausreichend um eine Überexpression auf RNA und Proteinebene zu erreichen. Die höhere Konzentration sollte die Wahrscheinlichkeit erhöhen auch schwache Effekte sichtbar zu machen. Nach vier Tagen wurden die Proben mit der MACS-Methode aufgereinigt.

Für jeden der betrachteten Transkriptionsfaktoren wurden zwei unabhängige Klone untersucht. Zusätzlich wurden Luciferasekontrollen mitgeführt. Die Fraktionen der Aufreinigung wurden aufgefangen, ihr ngfr-Status mittels FACS-Analyse ermittelt und dann einer Westernblot-Analyse unterzogen. Auf den Blots wurden jeweils das Eluat 1 als positive Fraktion (+) und der Durchlauf 2 als negative Fraktion (-) nebeneinander aufgetragen. Die beiden getesteten Konzentrationen wurden dabei auf verschiedene Blots geladen.

Für die E2A- und Pax5- überexprimierenden EZK ist nur das Ergebnis der niedrigeren Doxycyclin-Konzentration gezeigt, da die starken Signale in der Westernblot-Analyse die Prozessierung der Blots für die höhere Überexpression sehr erschwerte. Außerdem sind beide Faktoren bereits bei der geringeren Doxycyclin-Menge deutlich überexprimiert, wie in Abbildung 20 zu sehen ist. Insbesondere die Expression von E2A ist so stark, dass sie bei längerer Exposition benachbarte Banden überstrahlt. Sowohl Pax5 als auch E2A sind in den positiven Fraktionen deutlich angereichert. Interessanterweise ist Pax5 in den positiven Fraktionen der E2A-Klone deutlich schwächer exprimiert.

Die AID-Proteinmengen in Eluat und Durchlauf sind bei einigen Klonen zwar unterschiedlich, dies gilt allerdings auch für die Luciferasekontrollen. Die Unterschiede sind zwischen den beiden unabhängigen Klonen, die für jeden Vektor untersucht wurden, nicht konsistent, so dass es sich vermutlich nicht um Effekte der Überexpression auf die AID-Proteinmenge handelt.

Im unteren Teil der Abbildung 20 B sind die Ergebnisse für die Überexpression von Bcl6 und c-Myc für beide Überexpressionsstärken dargestellt. In den Bcl6 überexprimierenden Klonen erkennt man eine starke Anreicherung von Bcl6-Protein in der positiven Fraktion. Für die c-Myc-Klone ist nur für den linken eine Anreicherung sichtbar, die in ihrer Stärke auch deutlich hinter der der Bcl6-Klone zurückbleibt. Die Überexpression von c-Myc ist also in Einzelzellklonen ebenso wie im Batch schwierig.

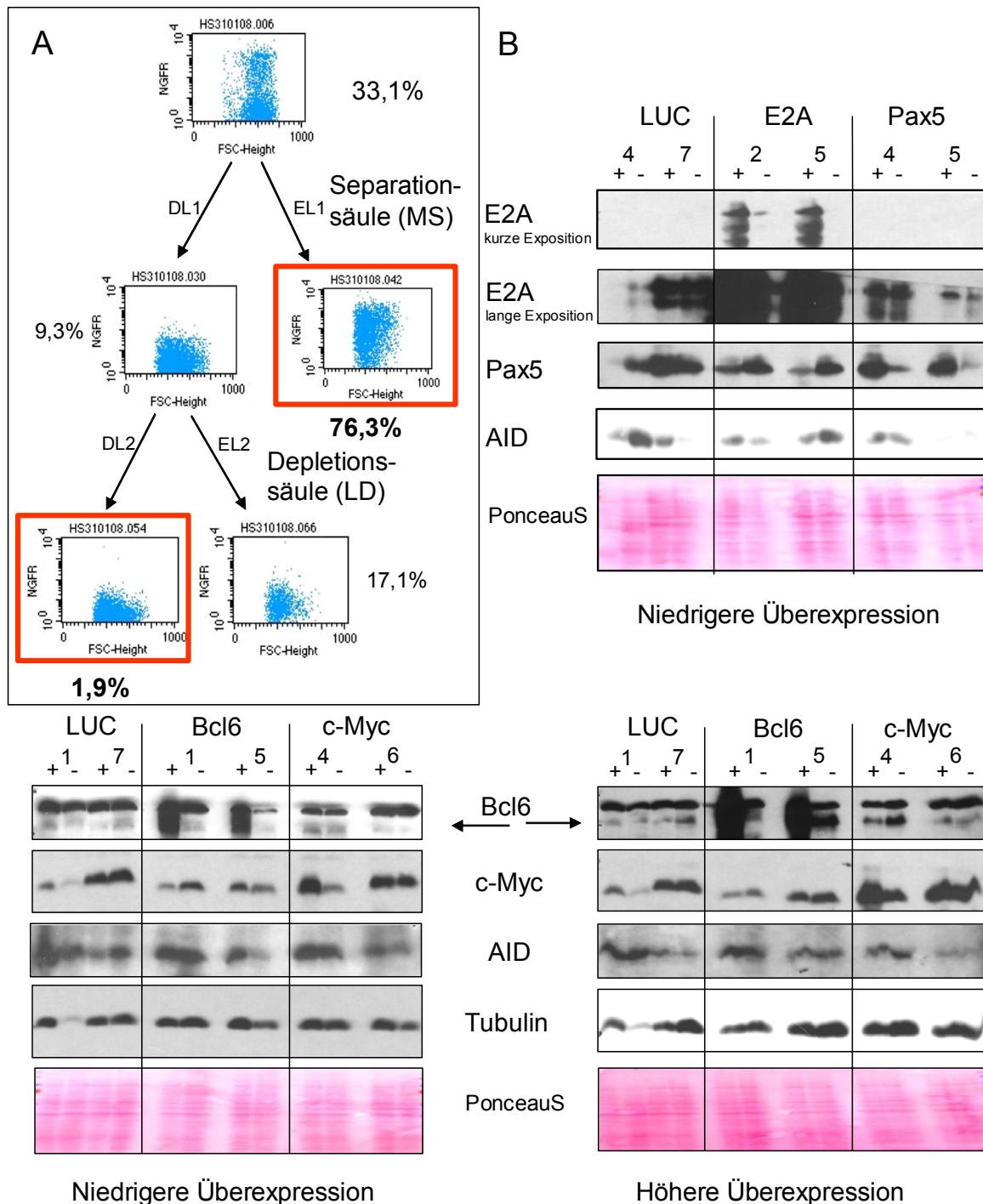


Abbildung 20: Zweistufige MACS-Reinigung und Anwendung auf überexprimierende Einzelzellklone

A) Zweistufige MACS-Reinigung über einer Separationssäule, deren Eluat (EL) als positive Fraktion verwendet wurde und einer anschließenden Depletionssäule, deren Durchlauf (DL) als negative Fraktion verwendet wurde. Die Prozentzahlen geben den Anteil ngfr-positiver Zellen in den verschiedenen Fraktionen an, die durch FACS-Analyse ermittelt wurden und hier für lebende Zellen gezeigt werden. **B)** Westernblot-Analyse für die Expression von E2A, Pax5, Bcl6, C-Myc und AID in je zwei unabhängigen Raji-Überexpressionsklonen. Aufgetragen sind die positive Fraktion (EL1, „+“) und die negative Fraktion (DL2, „-“) nach einer zweistufigen MACS-Aufreinigung. Tubulin und PonceauS dienen als Ladekontrollen. Die niedrigere Überexpression wurde mit 40ng/ml, die höhere mit 200ng/ml Doxycyclin induziert.

Keiner der beiden Faktoren zeigt in diesem experimentellen Ansatz einen stringenten Effekt auf AID. Zwar erscheint für den Bcl6-überexprimierenden Klon Bcl6.5 bei der niedrigen Überexpression die Bande in der positiven Fraktion deutlich stärker, da dieser Effekt aber

weder in der höheren Überexpressionsstärke noch in dem zweiten unabhängigen Klon auftritt, kann eine zufällige Schwankung als Ursache nicht ausgeschlossen werden.

Damit muss festgestellt werden, dass im hier verwendeten experimentellen System für die Überexpression keines der Transkriptionsfaktoren ein Effekt auf AID nachgewiesen werden konnte.

3.4.5 Einfluss der Transkriptionsfaktor-Überexpression auf CD77

Neben den AID-Leveln korrelierte der Zentroblastenphänotyp beziehungsweise die Präsenz CD77-positiver Zellen in einem Vergleich verschiedener Zelllinien mit deren Hypermutationsaktivität (siehe 3.2.1). Deswegen wurde der Versuch unternommen Effekte der Überexpression der Transkriptionsfaktoren auf CD77 zu untersuchen. Dazu wurden in CD38/CD77-Doppelfärbungen in uninduzierten versus fünf Tage lang mit 1000ng/ml Doxycyclin-induzierten EZK durchgeführt. Um den CD77-Status in tatsächlich überexprimierenden Zellen zu bestimmen wurden außerdem ngfr/CD77-Doppelfärbungen verwendet.

In Abbildung 21 sind die Ergebnisse exemplarisch dargestellt. In der obersten Zeile ist für die Induktion von pax5 das Auftreten einer CD38/CD77-negativen Fraktion zu erkennen. Diese ist kein Effekt von Pax5, da die Färbungen von Luciferase-überexprimierenden Zellen zu ähnlichen Ergebnissen führten, wie in der zweiten Zeile zu erkennen ist. Um zu klären, ob es sich um einen Effekt der Zugabe von Doxycyclin oder um einen Nebeneffekt der Überexpression handelt, wurden ngfr/CD77-Doppelfärbungen betrachtet. Hierbei zeigt sich ein niedrigeres CD77-Signal in ngfr-positiven Zellen (rechte Spalte). Außerdem wurden uninduzierbare Zellen (Klon Cmyc.2) betrachtet, da hier zwar Effekte der Doxycyclin-Zugabe, aber keine der ngfr-Induktion auf die CD77-Färbung sichtbar sein sollten. In der dritten Zeile erkennt man tatsächlich einen geringeren Anteil der CD38/CD77-negativen Zellen. Der Verlust der CD77-Oberflächenexpression ist außerdem konzentrationsabhängig, wie man bei Induktion des Klons Pax.4 mit unterschiedlichen Mengen Doxycyclin erkennen kann (vierte Zeile).

Leider ist deshalb in diesem experimentellen System keine Aussage über mögliche Effekte einzelner Transkriptionsfaktoren auf die CD77-Oberflächenexpression möglich.

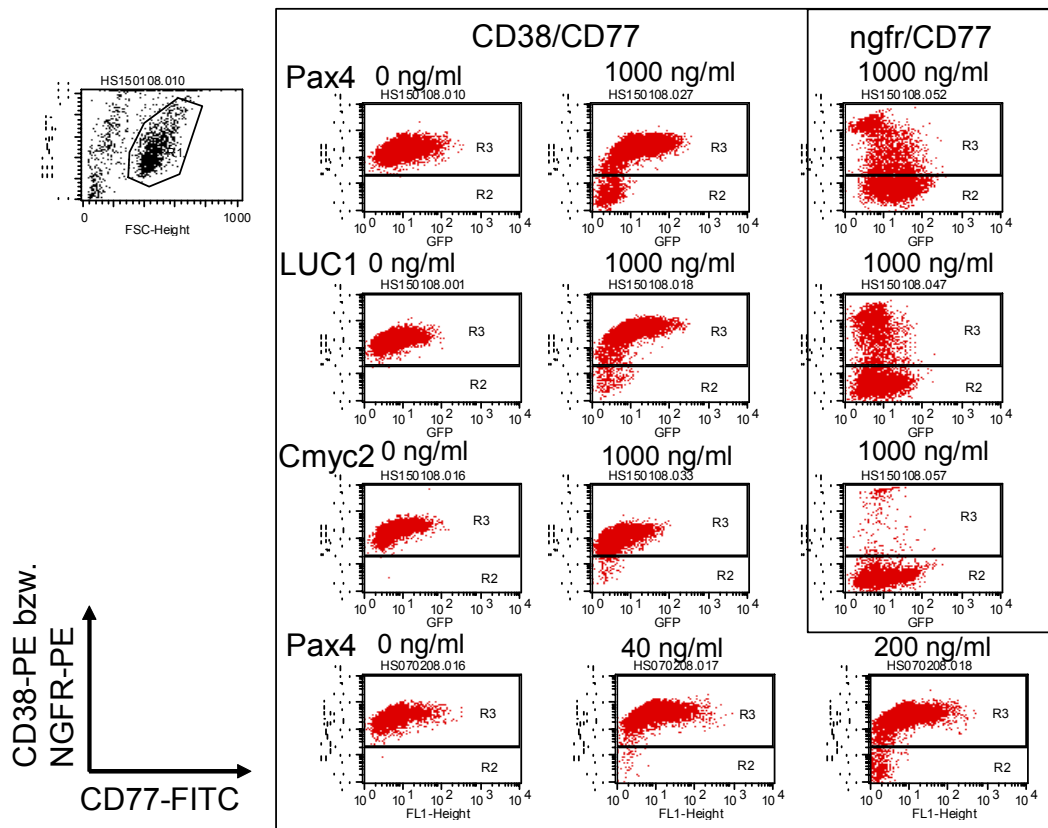


Abbildung 21: CD77-Expression bei Überexpression der Transkriptionsfaktoren in Einzelzellklonen

Die Raji-Einzelzellklone wurden für drei Tage mit der angegebenen Menge Doxycyclin im Medium kultiviert und dann eine CD38- bzw. ngfr-Doppelfärbung mit CD77 durchgeführt. Gezeigt sind 20.000 lebende Zellen für jede FACS-Messung.

3.5 Auswirkungen der Überexpression auf die SHM

3.5.1 Hypermutationsassays in Batchkulturen verschiedener Zelllinien

Es wurden zahlreiche Versuche unternommen Hypermutationsassays gekoppelt mit der Überexpression von Transkriptionsfaktoren in Batchkulturen durchzuführen. Dazu wurden der Hypermutationsreporter und der Überexpressionsvektor gleichzeitig in die Zellen transfiziert. Obwohl die Transfektionseffizienz für die Aufnahme beider Vektoren nicht wesentlich geringer ist als für die Transfektion mit nur einem Vektor, war die anschließende Selektion nicht erfolgreich. Da diese Vorgehensweise den gleichzeitigen Zusatz von zwei Antibiotika zu den Zellen bedeutete, wurden Schritte eingeleitet dies zu optimieren. Titrationsversuche mit beiden Antibiotika und mit Kombinationen von beiden ergaben eine stark erhöhte Toxizität bei der parallelen Zugabe (Daten nicht gezeigt). Darum wurden die Konzentrationen beider Antibiotika in der Doppelselektion gesenkt, aber auch unter diesen Bedingungen überlebten nicht ausreichend viele Zellen für einen fortlaufenden Hypermutationsassay. Da die FACS-Analyse für jeden Datenpunkt die Analyse von etwa einer Million lebender Zellen benötigt, war eine Analyse meist nur bis Tag 12 möglich, wenn

durch die erhöhte Zahl apoptotischer Zellen der gesamte Transfektionsansatz in die Analyse hätte eingesetzt werden müssen.

Auch Bemühungen, die Zahl der für FACS Analysen zur Verfügung stehenden Zellen durch einen späteren Einsatz der Antibiotika zu erhöhen, schlugen fehl, weil der verspätete Einsatz zu einem Verlust der Plasmide in der Kultur führte, wie am Absinken des Anteils GFP-positiver Zellen in der Transfektionskontrolle zu erkennen war.

Statt einer Selektion durch Antibiotikazugabe wurde auch eine Anreicherung der transfizierten Zellen durch eine MACS-Strategie in Betracht gezogen. Dazu wurden die Zellen am Tag nach der Transfektion mit Doxycyclin induziert und drei Tage später mittels des dann exprimierten ngfr-Rezeptors aufgereinigt. Es konnten jedoch nicht ausreichend Zellen dabei isoliert werden um die danach notwendigen FACS-Analysen für einen Hypermutationsassay durchzuführen. Zudem enthielten die Zellen nach der Transfektion einen erhöhten Anteil toter Zellen, die sich nach der MACS-Aufreinigung überproportional im Eluat wiederfanden.

Zusammenfassend muss deshalb festgestellt werden, dass die Kopplung von Überexpression und Durchführung eines Hypermutationsassays in Batchkulturen nicht möglich ist.

3.5.2 Hypermutationsassays in Einzelzellklonen der Raji-Zelllinie

Eine Alternative zu Hypermutationsassays im Batch ist die Durchführung in den vorhandenen Einzelzellklonen. Da diese bereits eine Selektion vollständig durchlaufen haben, ist bei Zugabe von einem weiteren Antibiotikum mit weniger Schwierigkeiten zu rechnen als bei einer Doppelselektion. Auch hier wurden die Antibiotikamengen allerdings entsprechend der Ergebnisse der Titrationsversuche gesenkt um Effekte der erhöhten Toxizität auszuschließen.

Um die Effekte der Überexpression möglichst sensitiv zu erkennen wurden für jeden Transkriptionsfaktor zwei Klone mit dem Hypermutationsreporter transfiziert und zunächst ohne Zugabe von Doxycyclin, also ohne Induktion einer Überexpression, unter Selektion gesetzt. Erst nach Abschluss der Selektion wurde der Transfektionsansatz geteilt und mit zwei verschiedenen Konzentrationen Doxycyclin induziert. Ein Teil des Ansatzes wurde ohne Induktion weitergeführt.

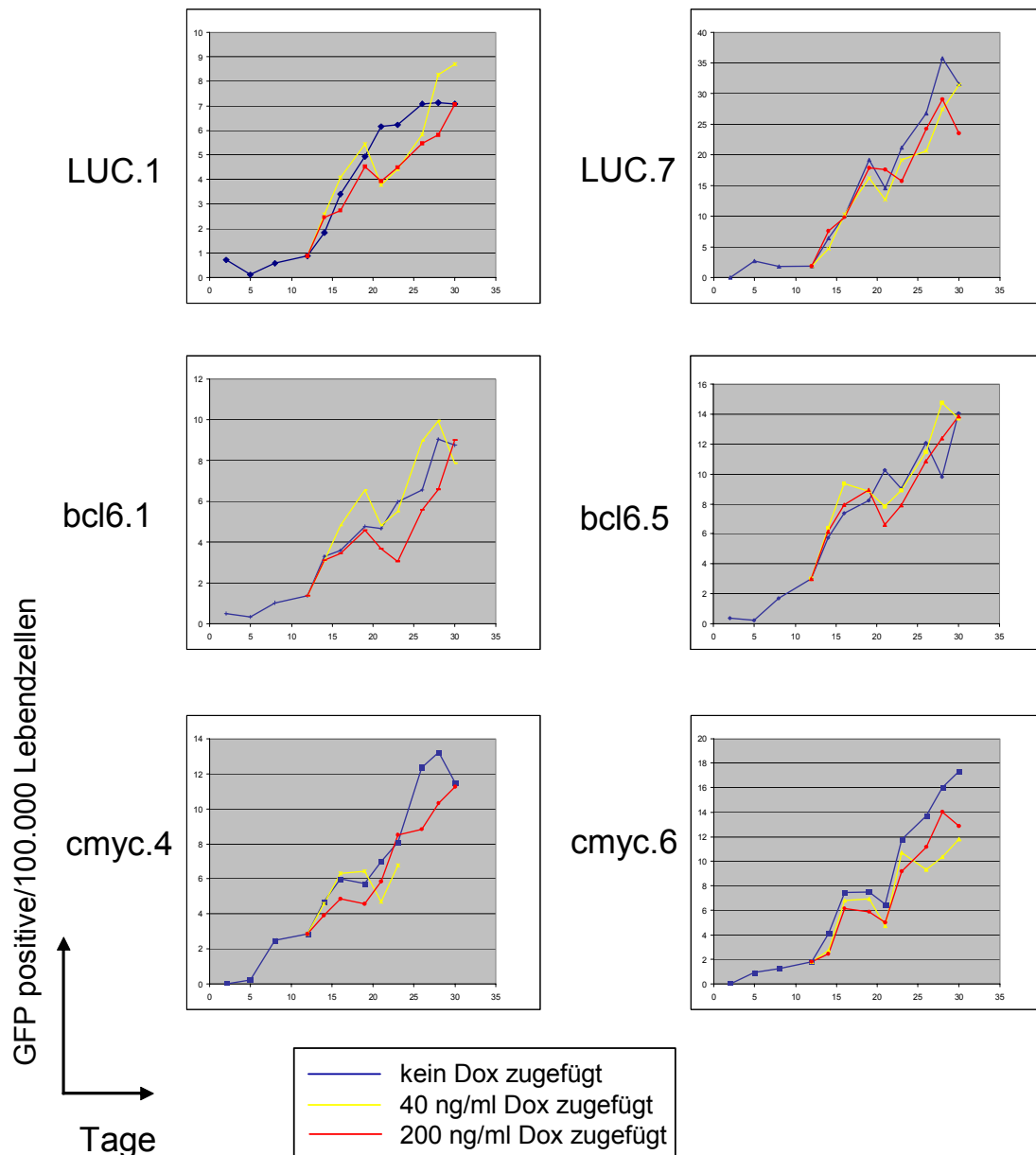


Abbildung 22: Somatische Hypermutation in Bcl6- und c-Myc-überexprimierenden Einzelzellklonen

In jeweils zwei Zellklonen für jeden der Faktoren und eine Luciferasekontrolle wurde der Hypermutationsreporter transfiziert und die Zellen unter Selektion gesetzt. Nach Abschluss der Selektion an Tag 12 wurden die Kulturen aufgeteilt und ohne, mit 40 ng/ml oder mit 200 ng/ml Doxycyclin induziert. Der Anteil grüner Zellen über den Verlauf von 30 Tagen wurde über FACS Analysen ermittelt. Für den links dargestellten c-Myc-Überexpressionsklon musste die 40 ng/ml-Probe wegen einer Kontamination an Tag 25 aus der Analyse genommen werden.

Wie in Abbildung 22 und Abbildung 23 zu sehen zeigt keiner der Hypermutationsassays eine deutliche Abweichung der mit Doxycyclin behandelten Zellen von den unbehandelten Zellen.

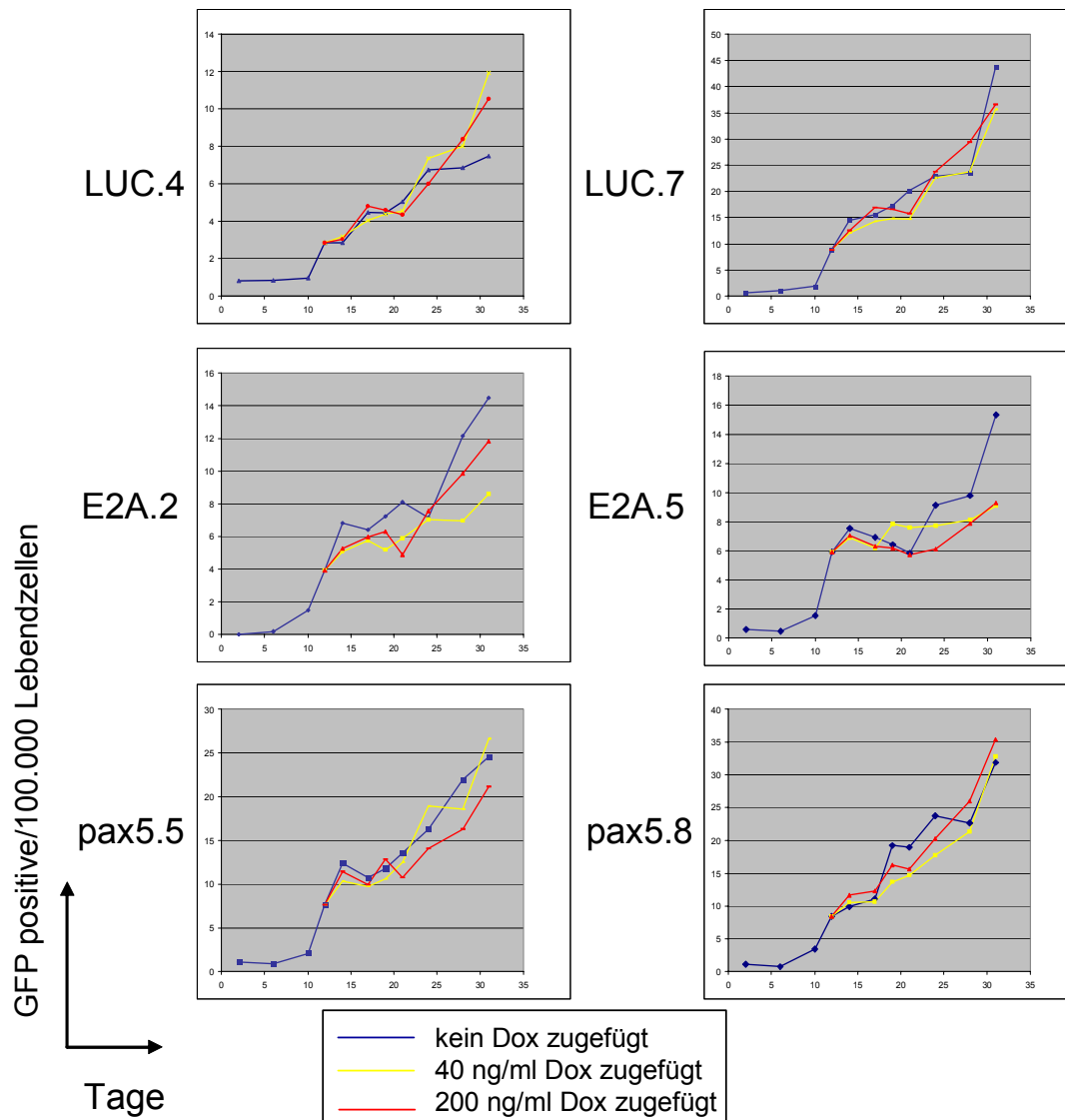


Abbildung 23: Somatische Hypermutation in E2A- und Pax5-überexprimierenden Einzelzellklonen

In jeweils zwei Zellklone für jeden der Faktoren und eine Luciferasekontrolle wurde der Hypermutationsreporter transfiziert und die Zellen unter Selektion gesetzt. Nach Abschluß der Selektion an Tag 12 wurden die Kulturen aufgeteilt und ohne, mit 40 ng/ml oder mit 200 ng/ml Doxycyclin induziert. Der Anteil grüner Zellen über den Verlauf von 30 Tagen wurde über FACS Analysen ermittelt.

Um auszuschließen, dass das verwendete Versuchsdesign eine zu geringe Sensitivität aufweist um veränderte Raten von Hypermutation zu detektieren, wurden AID-überexprimierende Einzelzellklone in einem entsprechenden Assay getestet.

In Abbildung 24 ist zu erkennen, dass die direkte Überexpression von AID zu einer klaren Erhöhung der somatischen Hypermutation führt. Die Sensitivität des Assays ist also ausreichend um potentielle Hypermutationseffekte durch induzierte Überexpression zu detektieren.

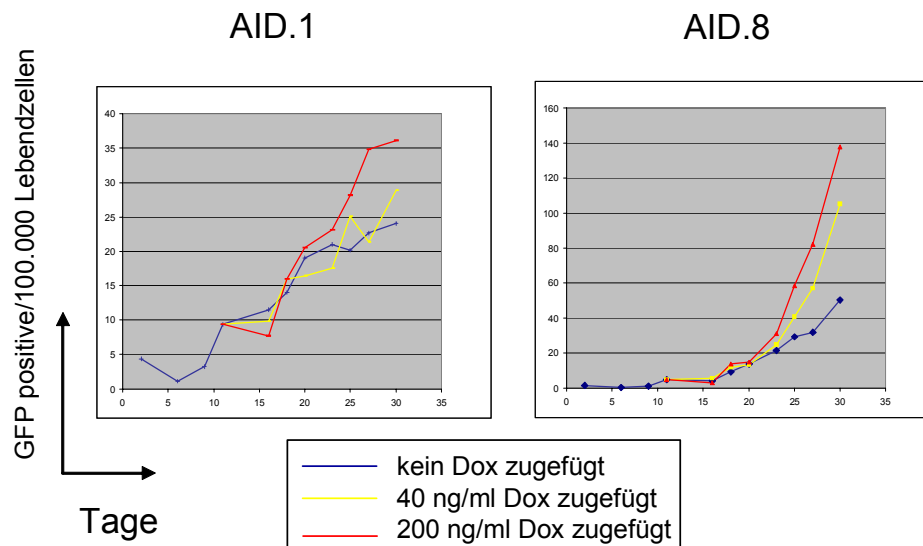


Abbildung 24: Hypermutationsassay bei Überexpression von AID in Einzelzellklonen

Entsprechend der Experimente für die Transkriptionsfaktoren wurde der Hypermutationsreporter in zwei Zellklone transfiziert und die Zellen unter Selektion gesetzt. Nach Abschluss der Selektion an Tag 11 wurden die Kulturen aufgeteilt und ohne, mit 40 ng/ml oder mit 200 ng/ml Doxycyclin induziert. Der Anteil grüner Zellen wurde über den Verlauf von 30 Tagen über FACS-Analysen ermittelt.

3.5.3 Verlauf der Überexpression innerhalb der Hypermutationsassay

Das Fehlen eines Effekts der Überexpression auf die Hypermutation stellt die Frage nach dem Erfolg der Überexpression innerhalb des Assays. Darum wurde mit drei verschiedenen Ansätzen das Maß der Überexpression im Assay kontrolliert. Zum einen wurde nach der Zugabe von Doxycyclin in Teile der Kultur regelmäßig eine FACS-Analyse auf die Oberflächenexpression von ngfr durchgeführt, zum anderen wurden 20 Tage nach Beginn des Assays, also eine Woche nach Beginn der Induktion, Pellets entnommen und auf die Expression der entsprechenden Proteine überprüft. Zusätzlich wurde am Ende des Assays eine MACS-Aufreinigung wie in 3.4.3 beschrieben durchgeführt.

Wie aus Tabelle 4 zu entnehmen variieren die Anteile der ngfr-positiven Zellen beträchtlich zwischen den Einzelzellklonen. Während einige wie AID.8 während des gesamten Assays unterhalb von 10% liegen, steigen die Anteile in anderen wie Cmyc.6 auf um die 50% an. Die Induktion mit höheren Mengen Doxycyclin führt im Schnitt zu einem etwas höheren Anteil ngfr-positiver Zellen. Deshalb ist es umso wichtiger die tatsächliche Überexpressionsstärke auf Proteinebene zu untersuchen.

Tabelle 4: Ergebnisse der Ngfr-Färbung innerhalb der somatischen Hypermutationsassays

Klon	1.Ngfr Färbung	2.Ngfr Färbung	3.Ngfr Färbung
LUC.1	0,72 / 1,09	3,54 / 4,05	8,09 / 11,43
LUC.4	0,72 / 1,53	8,33 / 13,88	13,72 / 26,16
LUC.7	17,21 / 21,25	22,78 / 25,76	38,65 / 44,73
bcl6.1	2,96 / 3,69	7,03 / 7,87	13,85 / 15,21
bcl6.5	6,58 / 8,10	11,56 / 13,9	18,15 / 19,37
cmyc.4	8,28 / 11,72	31,07 / 30,53	- / 40,05
cmyc.6	26,12 / 28,3	41,3 / 46,07	51,85 / 43,52
pax.5	13,93 / 17,06	13,24 / 16,39	24,52 / 32,09
pax.8	8,18 / 12,88	15,63 / 20,05	34,6 / 40,23
E2A.2	27,1 / 39,67	22,11 / 26,95	35,93 / 59,6
E2A.5	6,27 / 11,52	17,89 / 23,59	27,96 / 36,22
AID.1	3,71 / 6,89	8,63 / 10,32	8,62 / 9,83
AID.8	4,23 / 4,29	7,01 / 7,67	9,43 / 9,45

Für die verschiedenen Einzelzellklone sind die prozentualen Anteile ngfr-positiver Zellen für drei aufeinanderfolgende Messungen innerhalb des Assays dargestellt. Die Zahl vor dem Trennstrich wurde in der Probe mit 40 ng/ml Doxycyclin, die dahinter in der Probe mit 200 ng/ml Doxycyclin ermittelt. Die uninduzierten Proben lagen in allen Messungen unterhalb 1% und sind hier deshalb nicht wiedergegeben.

Für Bcl6 und c-Myc zeigt sich wie aus Abbildung 25 zu entnehmen eine deutliche Überexpression bei beiden Doxycyclin-Konzentrationen. Dass dies auch für Bcl6 nachweisbar ist, ist erstaunlich, weil der prozentuale Anteil der überexprimierenden Zellen in diesen Klonen deutlich niedriger war. Es sind jedoch keine konsistenten Unterschiede in der AID-Proteinmenge zu erkennen.

Auch die Überexpression von E2A und Pax5 ist innerhalb des Assays bei beiden Doxycyclin-Konzentrationen deutlich nachweisbar. Die AID-Level zeigen jedoch keinen Effekt dieser Überexpression.

Um die Proteinmengen in den überexprimierenden Zellen zu vergleichen, wurde am Ende des Assays für die Proben der höheren Dox-Konzentration eine zweistufige MACS-Aufreinigung vorgenommen und die positive versus die negative Fraktion auf Westernblots untersucht. Zusätzlich wurden uninduzierte Zellen der gleichen Behandlung unterzogen und als Negativkontrolle auf den Gelen mitgeführt.

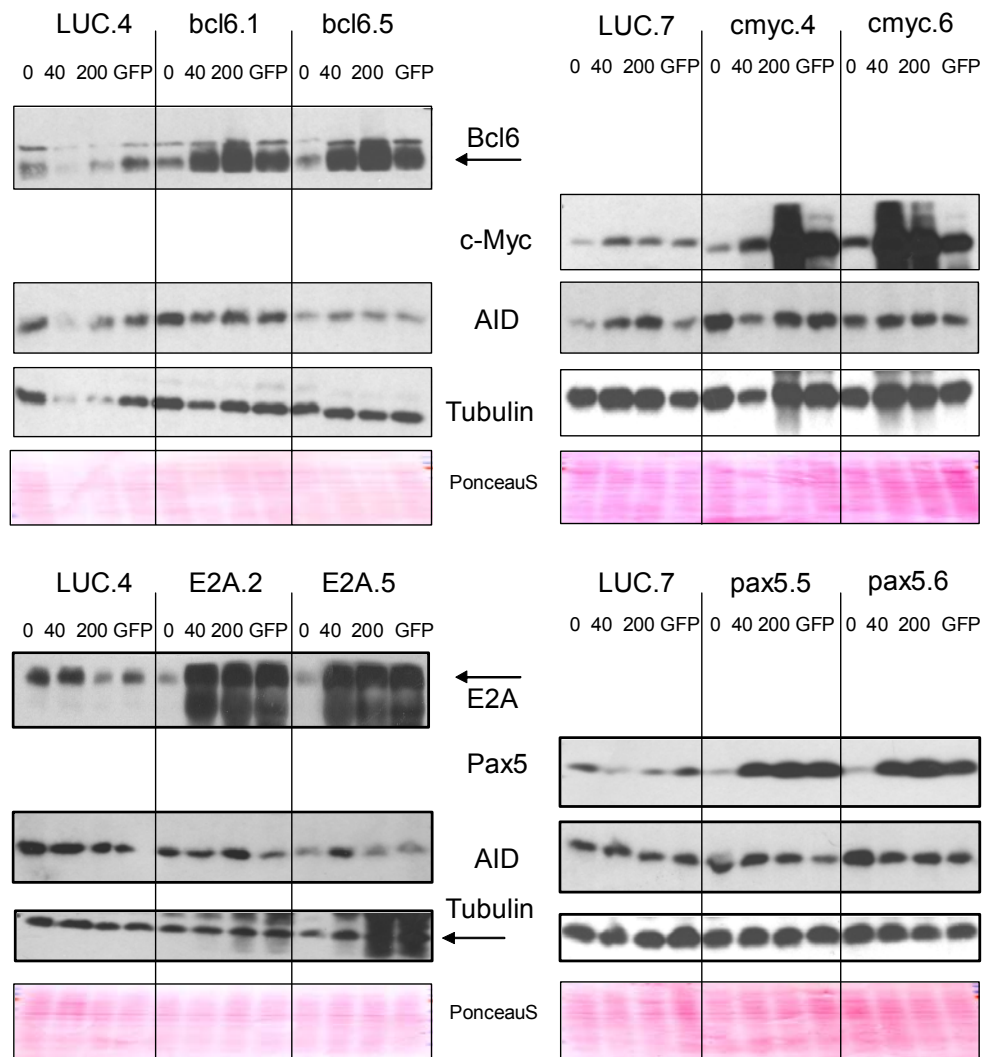


Abbildung 25 Überexpression der Transkriptionsfaktoren während des Hypermutationsassays

Für die überexprimierenden Klone wurden an Tag 20 des Hypermutationsassays Proben genommen und in einer Westernblot-Analyse auf die Proteinexpression der entsprechenden Transkriptionsfaktoren und von AID überprüft. Die Beschriftung mit 0, 40 und 200 bezeichnet die zugegebene Menge Doxycyclin in µg/ml. Die GFP-Probe wurde ebenfalls mit 200 µg/ml Doxycyclin behandelt. Tubulin und PonceauS dienen als Ladekontrolle. Der Pfeil zeigt im Bcl6- und E2A-Blot die Höhe der richtigen Bande an. Die Tubulin-Bande im E2A Überexpressionsblot wird durch das Durchstrahlen des E2A-Signals zum Teil verdeckt.

Nach der MACS-Aufreinigung sieht man für alle Faktoren stark erhöhte Proteinmengen des jeweiligen überexprimierten Transkriptionsfaktors im Eluat in Relation zu den uninduzierten Zellen. Bei E2A ist jedoch auch im Durchlauf eine im Vergleich zur Negativkontrolle erhöhte Menge Protein nachweisbar, was auf eine unvollständige Aufreinigung hindeutet.

Für keinen der Faktoren ist ein konsistenter Effekt auf AID erkennbar.

Um beurteilen zu können, wie groß oder klein Veränderungen im AID-Proteinlevel sein können, die einen nachweisbaren Effekt auf die Hypermutation zeigen, wurden die Proteinmengen für die direkte AID-Überexpression im Hypermutationsassay ermittelt. Wie

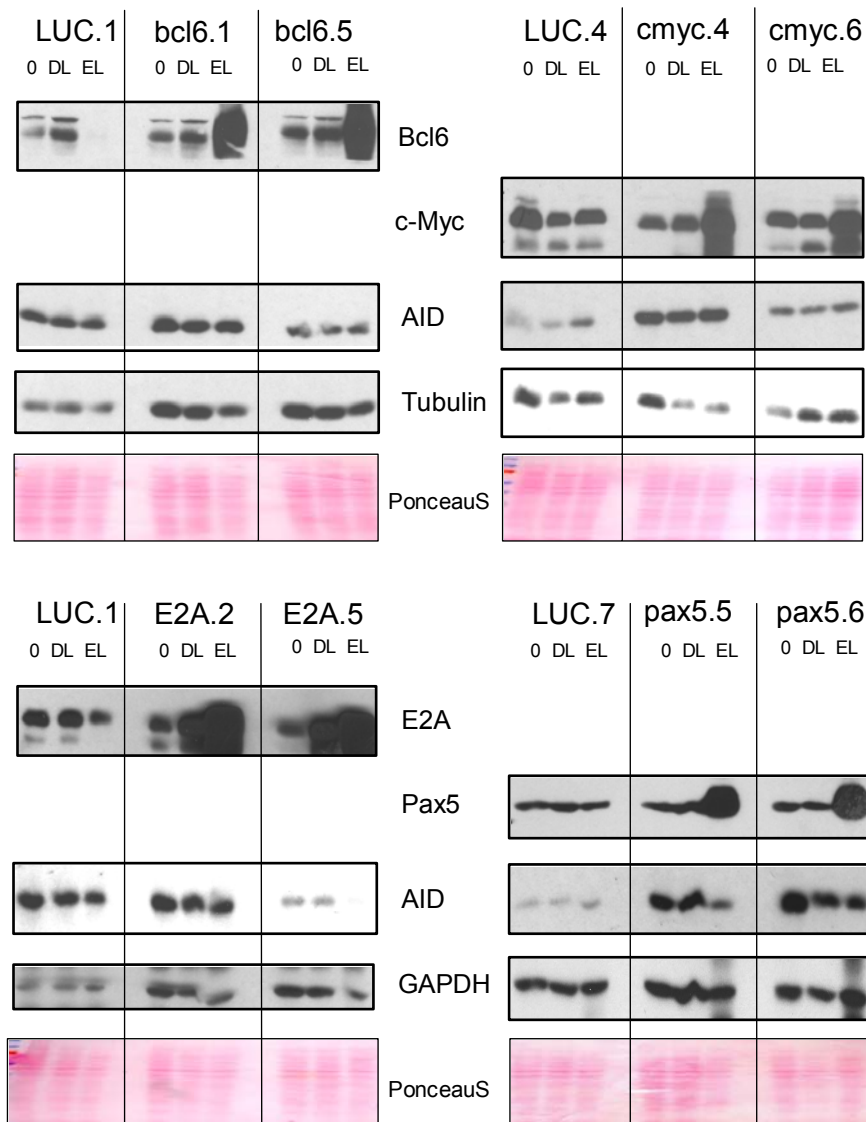


Abbildung 26: Überexpression in den ngfr-positiven Zellen der Hypermutationsassays

Die mit 200 ng/ml Doxycyclin induzierten Zellen für je zwei Klone pro untersuchtem Transkriptionsfaktor wurden nach Abschluss des Assays an Tag 30 einer zweistufigen MACS-Aufreinigung unterzogen. Als Negativkontrolle wurden auch die uninduzierten Zellen über eine LD-Säule aufgereinigt. Die Proben wurden in einer Westernblot-Analyse auf die Proteinmenge des entsprechenden Transkriptionsfaktors und AID untersucht. Tubulin bzw GAPDH und PonceauS dienen als Ladekontrolle.

in

Abbildung 27 zu erkennen sind die Mengen des überexprimierten HA-AID geringer als die bereits vorhandenen endogenen Proteinmengen. Es waren in diesen Klonen jedoch weniger als 10% der Zellen in den FACS-Analysen ngfr-positiv (Tabelle 4: Ergebnisse der Ngfr-Färbung innerhalb der somatischen Hypermutationsassays), was bedeuten könnte, dass die ngfr-positiven Zellen eine starke Überexpression aufweisen.

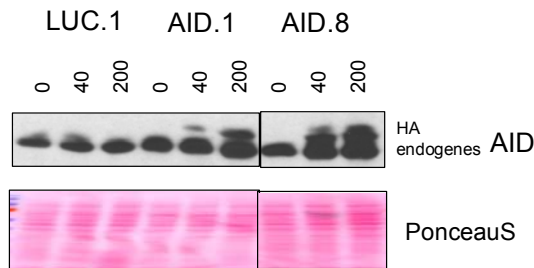


Abbildung 27: AID-Überexpression während des Hypermutationsassays

Die Zellen wurden mit 0, 40 oder 200 ng/ml Doxycyclin induziert, nach einer Woche ein Pellet genommen und in einer Westernblot-Analyse auf AID Proteinmengen untersucht. Die zwei dabei auftretenden Banden sind HA-AID, das in den Zellen überexprimiert wird und eine etwas tiefere Bande für das endogene AID. PonceauS dient als Ladekontrolle.

Zusammenfassend gelang es zwar ein experimentelles System zur Überexpression der Transkriptionsfaktoren zu etablieren, das die Durchführung von Hypermutationsassays erlaubt, es zeigten sich in den Einzelzellklonen, die hierfür verwendet wurden, aber für keinen der Transkriptionsfaktoren Effekte auf AID oder die Hypermutation. Dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen der Batchkulturen verschiedener Zelllinien, in denen für die Überexpression von c-Myc und Bcl6 mögliche Effekte auf AID zu sehen waren. Eine unabhängige Bestätigung dieser Effekte war deshalb von großem Interesse.

3.6 Auswirkungen der Herunterregulation der Transkriptionsfaktoren

3.6.1 Klonierung der shRNA-Vektoren

Eine Alternative zur Untersuchung der Effekte von Transkriptionsfaktoren auf AID und die Hypermutation mittels Überexpression sind Untersuchungen, in denen die Aktivität oder Expression dieser Faktoren beschränkt wird. Neben der Verwendung von Inhibitoren, wie sie in 3.7.3 für c-Myc gezeigt wird, eignet sich hierfür die Manipulation mittels RNA-Interferenz (RNAi). Hierfür wurde im Rahmen früherer Arbeiten von B. Jungnickel ein vektorbasiertes RNAi-System etabliert, das in B-Zellen angewendet werden kann. Das System basiert auf einem episomalen Expressionsvektor mit einem U6-Promotor, über den die Polymerase III eine etwa 60 Basenpaare lange RNA produziert (siehe Abbildung 28). Deren Sequenz wird so gestaltet, dass sie zwei komplementäre Sequenzen enthält, getrennt durch einen nicht-komplementären Abschnitt. Nach Synthese durch die Polymerase lagern sich die komplementären Sequenzen aneinander und bilden dabei eine Haarnadelstruktur (*short hairpin: sh*). Diese shRNA kann durch Dicer prozessiert werden (Paddison et al., 2002), was durch Abspaltung der Loopsequenz aktive siRNAs erzeugt. Deren Rekrutierung durch den RNA-induzierten *silencing* Komplex (RISC) führt zu einer Restriktion der komplementären mRNA und zu einer translationalen Inhibition des Targetgens.

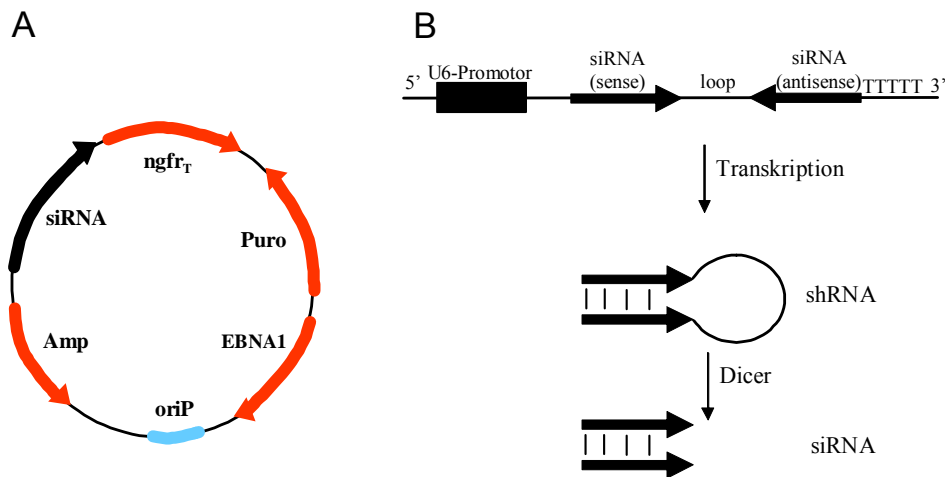


Abbildung 28: Vektor und Funktionsweise der Herunterregulation über siRNA

A) Schematische Darstellung des siRNA-Vektors: siRNA ist die in **B)** näher beschriebene siRNA-Kassette; *ngfr_T* trunkierter *nerve growth factor receptor*; *Puro*: Puromycinresistenzgen; *EBNA1*: EBV-Gen für episomalen Plasmiderhalt; *oriP*: *Origin of replication*; *Amp*: Ampizillinresistenzgen für Selektion in Bakterien **B)** siRNA Expressionskassette. U6-Promotor getriebene Transkription durch PolIII bringt den komplementären *sense* und *antisense* siRNA Strang in einer *small-hairpin* (sh)-Struktur zusammen, deren Prozessierung durch Dicer zu aktiven siRNAs führt.

Für E2A, *pax5*, *c-myc* und AID lagen bereits Vektoren vor. Es wurden deshalb drei shRNA-Vektoren gegen *bcl6* entwickelt (Details siehe 6.2.5).

3.6.2 RNA Interferenz für *bcl6* und *c-myc*

Die neuen gegen *bcl6* gerichteten Vektoren und die im Gegensatz zu den gegen *pax5* und E2A gerichteten Vektoren (T. Thiel Diplomarbeit) noch nicht vollständig geprüften gegen *c-myc* gerichteten Vektoren wurden in Raji-Zellen transfiziert. Nach vier Tagen wurde eine MACS-Aufreinigung über eine Separationssäule durchgeführt und die Zellen im Vergleich mit geeigneten Positiv- und Negativkontrollen einer quantitativen RT-PCR-Analyse unterzogen (siehe Abbildung 29 A).

Dabei war für Bcl6 eine Verringerung der *bcl6*-mRNA-Level auf 30-50% der Level in den Negativkontrollen nachweisbar. Allerdings führte die Expression von AID-siRNAs ebenfalls zu einem Absinken der *bcl6*-mRNA-Mengen. Für *c-myc* konnte keine konsistente Verringerung der *c-myc* Level beobachtet werden. Bei der Untersuchung der AID-mRNA zeigte sich eine gute Effizienz für den gegen AID gerichteten Vektor mit einem Absinken der mRNA-Level auf etwa 25% der Ausgangsmenge. Auch bei der RNA-Interferenz durch Vektoren gegen *bcl6* sind die AID-mRNA-Mengen für zwei der drei Vektoren signifikant reduziert. Für *c-myc* lässt sich wegen des fehlenden Absinkens der mRNA-Level von *cmyc* selbst schwer eine Aussage über die Effizienz der RNA-Interferenz machen.

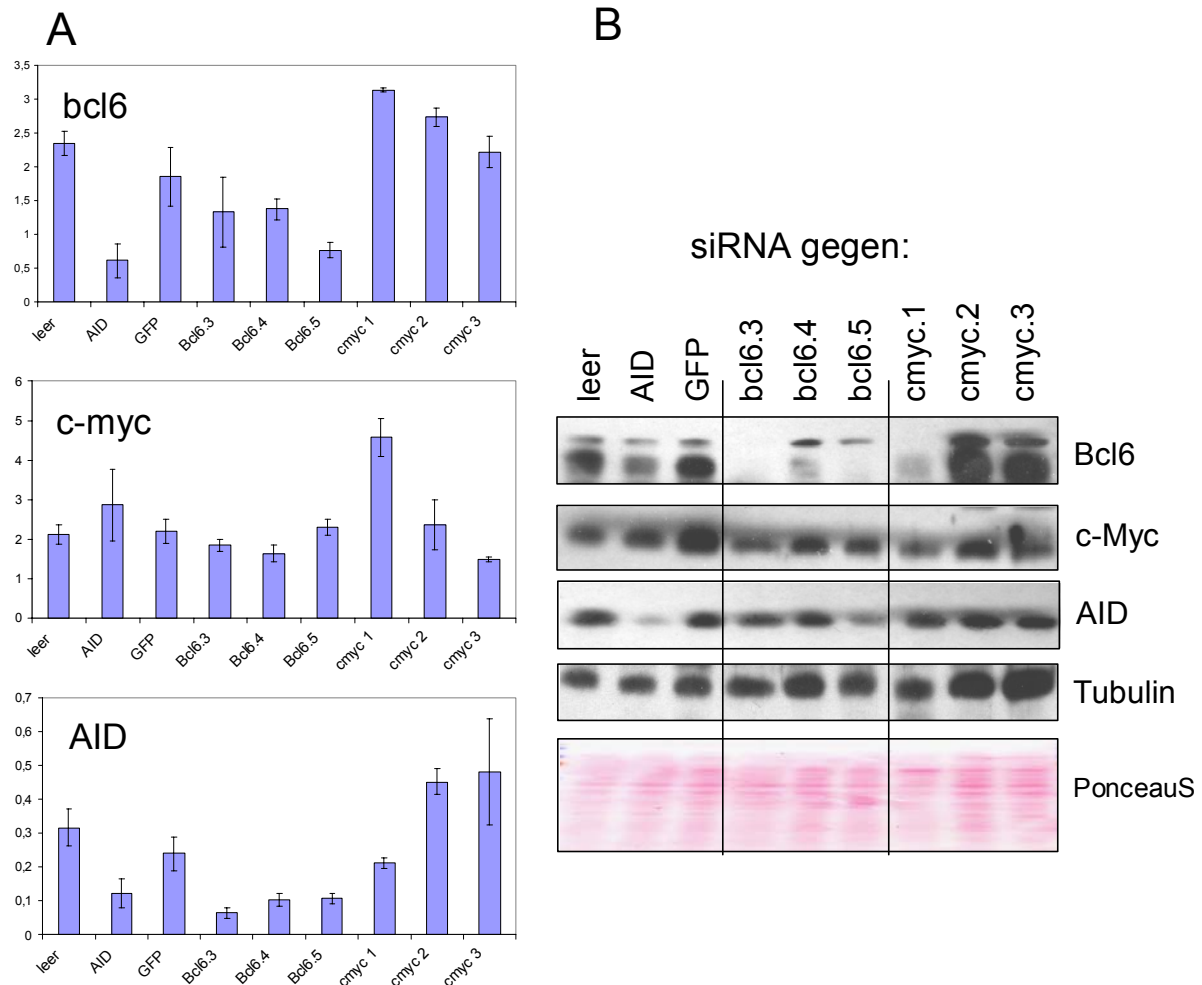


Abbildung 29: Herunterregulationseffizienz von siRNA gegen bcl6 und c-myc und Effekte auf AID

Raji-Zellen wurden mit RNAi-Vektoren transfiziert und nach vier Tagen die ngfr-positiven Zellen durch eine MACS-Reinigung isoliert. **A)** Aus Pellets dieser Zellen wurde mRNA isoliert und einer quantitativen RT-PCR-Analyse auf die mRNA-Level von bcl6, c-myc und AID unterzogen. Die Vektoren mit den siRNAs gegen bcl6 und c-myc sind zusammen mit einem Leervektor und einem GFP-Vektor als Negativkontrolle und einem getesteten gegen AID gerichteten Vektor als Positivkontrolle dargestellt. Die mRNA-Expression wurde auf die mRNA Level von ribL23b normalisiert. **B)** Weitere Pellets desselben Versuchs wurden zu Proteinextrakten verarbeitet und einer Westernblot-Analyse unterzogen, dabei wurden die Proteinlevel von Bcl6, c-Myc und AID bestimmt. Tubulin und PonceauS dienen als Ladekontrolle.

Da die Stärke der Effekte auf RNA Ebene zumindest für c-myc nicht überzeugend waren, wurden parallel die Effekte auf Proteinebene untersucht. Dazu wurden Pellets aus demselben Versuch verwendet, so dass Protein- und RNA-Daten vergleichbar sein sollten.

Wie in Abbildung 29 B zu sehen sind die Effekte der RNA-Interferenz gegen bcl6 auf Proteinebene sehr markant. Für c-myc ist auch auf Proteinebene kein deutlicher Effekt der Herunterregulation zu erkennen. Die Effekte auf AID entsprechen in etwa denen, die in den RNA-Daten zu erkennen waren. So ist für einen der bcl6-Vektoren eine deutliche, für einen anderen eine leichte Reduzierung der AID-Proteinmengen zu verzeichnen. Die c-myc-Vektoren zeigen in diesem Experiment keinen substantiellen Effekt auf AID.

3.6.3 RNAi für alle untersuchten Transkriptionsfaktoren

In einem größeren Versuchsansatz sollte nach den guten initialen Ergebnissen für alle vier TF der Effekt auf AID auf RNA- und Protein-Ebene untersucht werden. Dazu wurde das Experiment wie oben beschrieben durchgeführt, aber zusätzlich wurden je zwei Vektoren gegen E2A und Pax5 (beide von T. Thiel) mitgeführt.

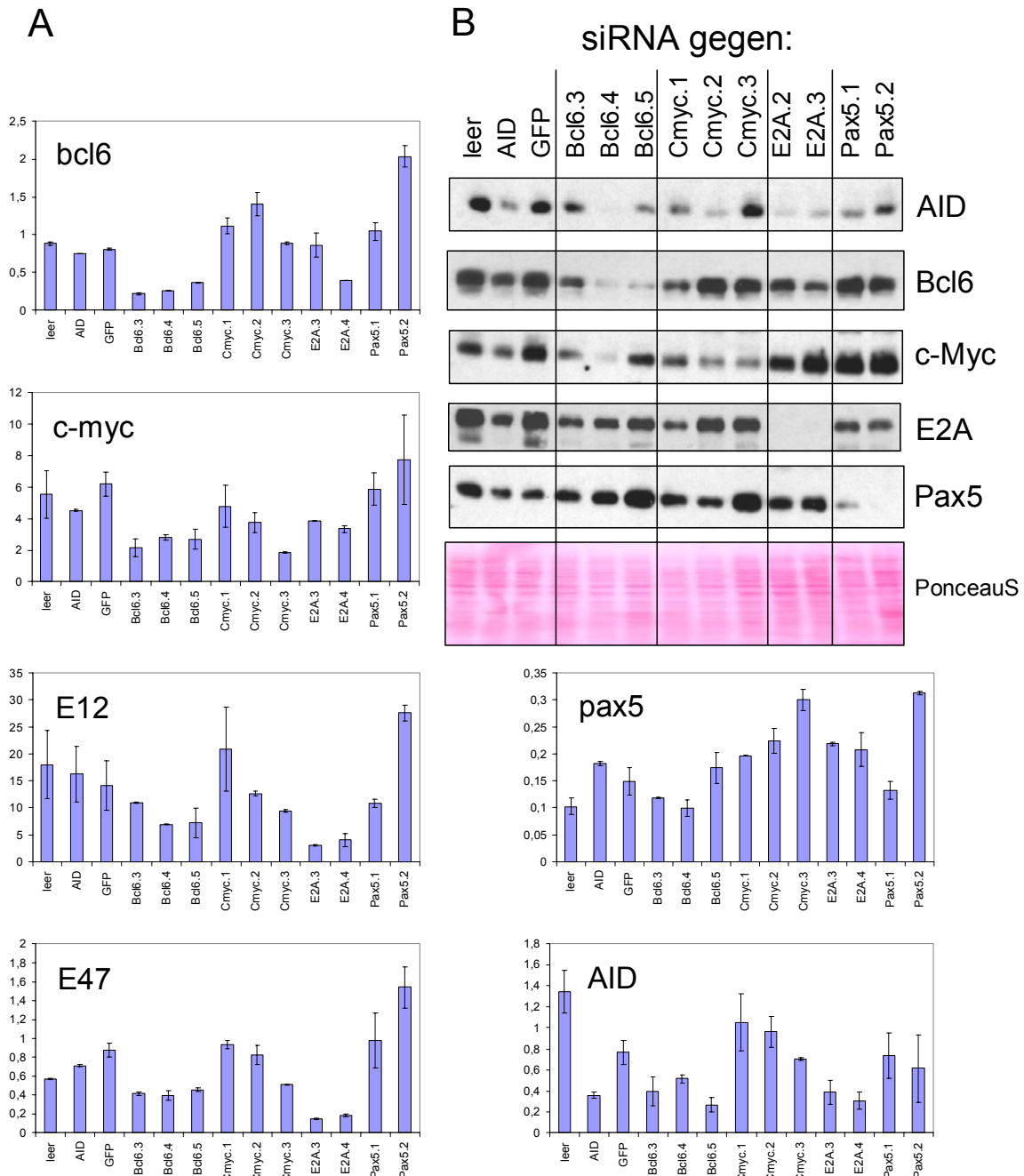


Abbildung 30: RNA-Interferenz für bcl6, c-myc, E2A und pax5

Raji-Zellen wurden mit RNAi-Vektoren transfiziert und nach vier Tagen die ngfr-positiven Zellen durch eine MACS-Reinigung isoliert. **A)** Aus Pellets dieser Zellen wurde mRNA isoliert und einer quantitativen RT-PCR-Analyse auf die mRNA-Level der Transkriptionsfaktoren und AID unterzogen. Die Experimente mit den siRNA-Vektoren gegen die Transkriptionsfaktoren sind zusammen mit einem Leervektor und einem GFP-Vektor als Negativkontrolle und einem getesteten gegen AID gerichteten Vektor als Positivkontrolle dargestellt. Die mRNA-Expression wurde auf die mRNA-Level von ribL23b normalisiert. **B)** Weitere Pellets desselben Versuchs wurden zu Proteinextrakten verarbeitet und einer Westernblot-Analyse unterzogen. PonceauS dient als Ladekontrolle.

In Abbildung 30 A ist zu erkennen, dass auch bei der Wiederholung des Experiments die Ergebnisse für die Effizienz der RNA-Interferenz von *bcl6* und *c-myc* weitgehend bestätigt werden. Bei den beiden hinzugekommenen Faktoren *E2A* und *pax5* fallen die Ergebnisse recht unterschiedlich aus. Da die Manipulation von *E2A* mit Sequenzen erfolgt, die nicht im differentiell gespleißten Bereich liegen, ist ein Effekt sowohl für die *E12*- als auch für die *E47*-Level sichtbar. Für *pax5* ist dagegen kein Absinken der mRNA Level nach Herunterregulation zu erkennen. *C-Myc* und *pax5* haben scheinbar keinen Einfluss auf die *AID* mRNA Level. RNA-Interferenz mit gegen *E2A* gerichteten shRNAs führt hingegen zu einem deutlichen Absinken der *AID*-Level in etwa demselben Maße wie für *bcl6* zu beobachten.

Aus der Westernblot-Analyse in Abbildung 30 B ist ersichtlich, dass die RNA-Interferenz der zusätzlichen Faktoren auf Proteinebene sehr effektiv ist. Dies ist für *Pax5* insofern überraschend, als die RNA-Level keine deutliche Veränderung zeigten. Für *c-Myc* sind die Proteinmengen in den RNAi-Proben niedriger als in den Kontrollen. Für die siRNAs gegen *E2A* und *Pax5* dagegen erscheinen die *c-Myc*-Proteinlevel erhöht. Die *Bcl6* Proteinmengen wurden mit zwei der drei Vektoren deutlich gesenkt und für diese Vektoren sind auch die *AID*-Proteinmengen geringer als in den Kontrollen.

Die *AID*-Level erscheinen neben den *Bcl6*-Proben auch in denen mit Vektoren gegen *E2A* niedriger. Für *Pax5* und *c-Myc* sind ebenfalls zum Teil negative Effekte zu sehen, die aber zwischen den Proben nicht einheitlich sind.

Insgesamt ist die RNA-Interferenz in der verwendeten Zelllinie effektiv und für die meisten Faktoren auch effizient. Die Ergebnisse auf Proteinebene zeigen dabei deutlichere Effekte als für mRNA der Fall, was auf verschiedene Mechanismen der RNA-Interferenz zurückzuführen ist, die nur teilweise direkt auf die mRNA-Level wirken.

Interessant ist der negative Effekt von RNA-Interferenz gegen *Bcl6* auf *AID* mRNA und Protein, da damit die Ergebnisse der Überexpression im Batch unabhängig bestätigt werden konnten. Für *E2A*-Depletion war ebenfalls ein negativer Effekt auf *AID* zu erkennen, für den die Überexpression keine Entsprechung liefert, wofür es verschiedene Ursachen geben kann.

3.7 C-Myc und Faktoren des Keimzentrumsprogramms

3.7.1 C-Myc und der Keimzentrumsphänotyp

Die Rolle von *c-Myc* im Keimzentrum ist in der Literatur umstritten (siehe Einleitung) und die Expression von *c-Myc* in Keimzentren wird dabei in Frage gestellt. Andererseits sind die in dieser Arbeit verwendeten hypermutierenden Zellen Burkitt-Lymphomzelllinien, deren

Charakteristikum eine Translokation von *c-myc* darstellt, womit sich die Frage nach der Bedeutung der (deregulierten) Expression von c-Myc und deren Einfluss auf die SHM und den Keimzentrumsphänotyp stellt. Hierzu liegen Ergebnisse der Diplomarbeit von S. Tobollik (Diplomarbeit, München) vor, die in einem konditionalen c-Myc-System einen Effekt von c-Myc auf CD77 beschreiben. Bevor näher auf die Rolle von c-Myc in Burkitt-Lymphomen eingegangen wurde (3.7.3), wurden zunächst in diesem System weitere Experimente durchgeführt. Deshalb wird an dieser Stelle zunächst das konditionale c-Myc Zellsystem besprochen (Abbildung 31).

Bei den Zelllinien EREB 2-5 und P493.6 handelt es sich um isogene Zelllinien. Naive B-Zellen wurden mit einem EBNA2-defizienten EBV-Stamm (P3HR1) und einem zusätzlichen Gen für ein Fusionsprotein aus dem Östrogenrezeptor und EBNA2 infiziert. Unter Zugabe von Östrogen proliferieren die Zellen auf einem EBV-Wachstumsprogramm. Ohne Östrogen proliferieren die Zellen nicht und leiten nach etwa fünf bis sechs Tagen die Apoptose ein (Kempkes et al., 1995). Aus dieser Zelllinie wurde durch die zusätzliche Transfektion mit einem Plasmid für das *c-myc*-Gen unter der Kontrolle eines Tet-regulierbaren Promotors und eines Tetrepressors („*tet-off*“ System) die Zelllinie P493.6. Diese weist vier Schaltzustände auf, weil durch Zugabe von Östrogen versus Tetracyclin getrennt voneinander c-Myc- und EBV-Wachstumsprogramme geschaltet werden können (Schuhmacher et al., 1999). In der P493.6-Zelllinie konnte in der Arbeit von S. Tobollik (S. Tobollik, Doktorarbeit) gezeigt werden, dass nach Zugabe von Tet, also nach Ausschalten von c-Myc der Anteil CD77-positiver Zellen sank. Dies wurde in einem initialen Versuch bestätigt (siehe Abbildung 32A). Um die Präsenz dieses Effekts in anderen Zelllinien zu untersuchen war jedoch ein anderer Ansatz nötig. Da siRNA gegen c-Myc keine ausreichende Effizienz aufweist (siehe 3.6.2) wurden zwei verschiedene Inhibitoren gegen c-Myc verwendet.

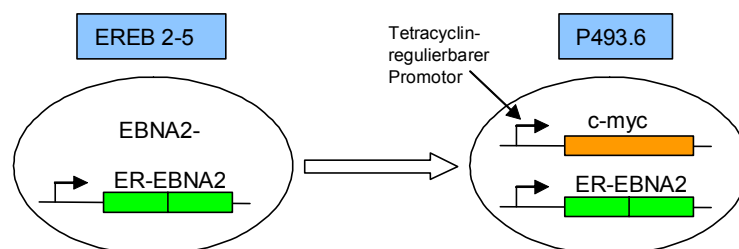


Abbildung 31: Schematische Darstellung der Etablierung einer konditionalen Zelllinie

In naive B-Zellen aus Nabelschnurblut wurde ein EBNA2-defizientes EBV-Virus (P3HR1) zusammen mit einem ER-EBNA2-Fusionsgen eingebracht. Nach Zugabe von Östrogen transloziert das sonst im Cytoplasma gebundene Fusionsprotein in den Kern. Dort ist es aktiv und der zentrale Regulator des Latenzprogramms III von EBV, das die Zellen immortalisiert. Durch Transfektion mit einem zusätzlichen Plasmid mit einem Tet-regulierbaren *c-myc* (aus der Zelllinie BL60) und einem Tetrepressor ergeben sich Zellen mit vier Schaltzuständen. Bei Zugabe von Tet wird das c-Myc deaktiviert.

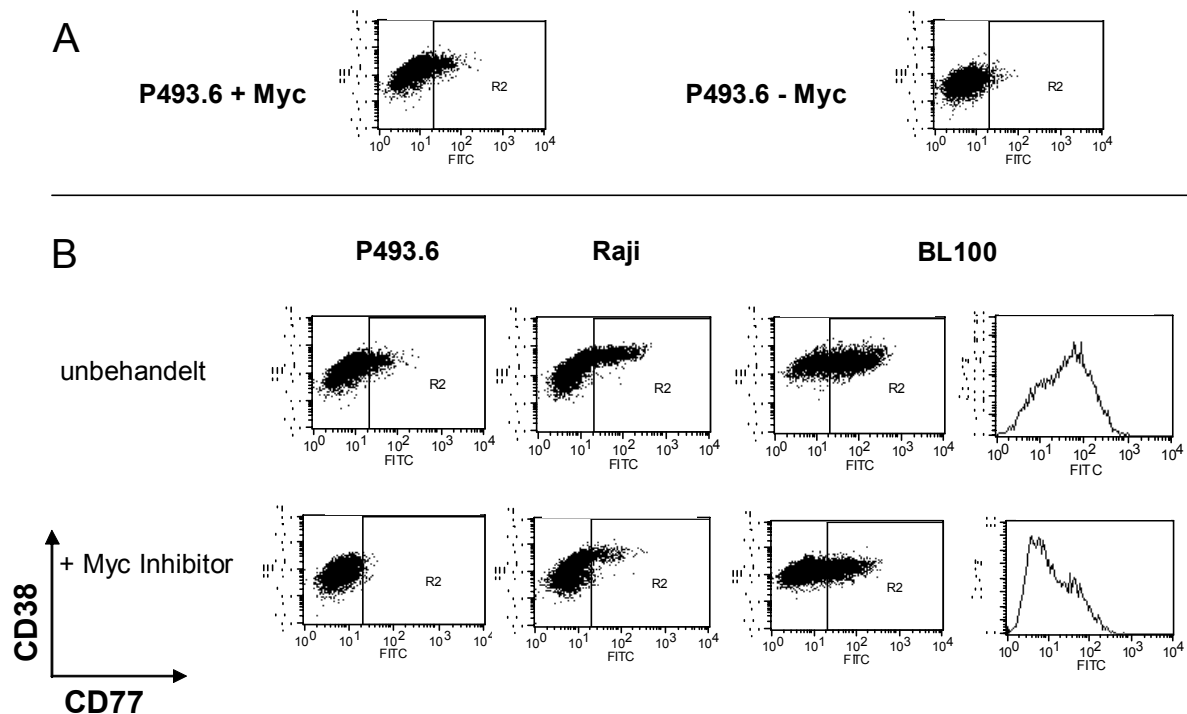


Abbildung 32: Einfluss von c-Myc auf den Zentroblastenmarker CD77

A) P493.6 Zellen wurden für fünf Tage mit Tetrazyklin inkubiert (-Myc), und anschließend im Vergleich mit einer unbehandelten Kultur (+Myc) einer CD38/CD77-FACS-Färbung unterzogen. Dargestellt sind 50.000 lebende Zellen. **B)** Die Zellen wurden für fünf Tage mit einem Myc-Inhibitor inkubiert und im Vergleich mit DMSO-Kontrollen einer CD38/CD77-FACS-Färbung unterzogen. Dargestellt sind 50.000 lebende Zellen, sowie für die Zelllinie BL100 ein Histogramm der lebenden Zellen bezüglich ihrer CD77-Positivität.

Nur für den kommerziell erhältlichen Inhibitor von Calbiochem waren jedoch Effekte auf Proliferation und Genexpression nachweisbar, so dass hier nur für diesen Inhibitor die Ergebnisse dargestellt werden, da für den alternativen Inhibitor (von T. Berg) die Funktionalität nicht gesichert ist. Der Inhibitor von Calbiochem hemmt spezifisch die Dimerisierung mit Max, die eine Voraussetzung für alle beschriebenen Funktionen von c-Myc ist (Wang et al., 2007; Yin et al., 2003). Der Einsatz des Inhibitors zeigte in P493.6 die selben Effekte auf CD77 wie die Zugabe von Tet (Abbildung 32B). Die Anwendung in den BL-Linien Raji und BL100 zeigten ebenfalls ein deutliches Absinken des Anteils CD77-positiver Zellen nach Zugabe des Inhibitors. Die verwendeten Inhibitorkonzentrationen waren dabei nicht toxisch und der Anteil lebender Zellen im FACS war unverändert (Daten nicht gezeigt). C-Myc hat also sowohl in konditionalen Zellsystemen als auch in BL-Zelllinien einen Einfluss auf die Expression des Oberflächenmarker CD77 und damit anscheinend auf den Keimzentrumsphänotyp.

3.7.2 C-Myc beeinflusst Transkriptionsfaktoren in der Zelllinie P493.6

Um einen möglichen transkriptionellen Einfluss von c-Myc auf Keimzentrumsfaktoren zu untersuchen wurden zunächst Kinetikexperimente über 24 bis 48 Stunden in P493.6-Zellen

durchgeführt. Da c-Myc in diesen Zellen die Proliferation steuert, wurde eine Proliferationskontrolle in den Versuchen mitgeführt. Die Zellen wurden für drei Tage in Anwesenheit von Tetrazyklin kultiviert, so dass die c-Myc-Level stark gesunken waren, und zum Zeitpunkt 0 h des Experiments in Medium ohne Tetrazyklin umgesetzt, was zu einer Expression von c-Myc führt. Weil die Zellen aber gleichzeitig beginnen zu proliferieren, wurden in einem parallelen Ansatz die Zellen in Medium ohne Serum aufgenommen. In diesem Fall proliferieren die Zellen nicht, aktivieren jedoch c-Myc (Schlosser et al., 2005). Es wurden nach 4, 8 und 24 Stunden Proben genommen. Als Kontrolle wurden aus der laufenden Kultur zu Beginn und Ende des Versuchs ebenfalls Pellets genommen und vergleichend analysiert.

Eine quantitative RT-PCR-Analyse der mRNA Mengen in den Proben ergab für das publizierte c-Myc-Targetgen *CDK4* (Hermeking et al., 2000) das erwartete Muster (siehe Abbildung 33). Die *CDK4*-Level sinken nach Zugabe von Tet stark ab und steigen nach Überführen in Tet-freies Medium wieder an. Dieser Anstieg ist unabhängig von der Proliferation, wie man am Verlauf in den serum-freien Proben erkennen kann. Betrachtet man nun die Ergebnisse für *AID* und *bcl6*, so unterscheiden sie sich deutlich von denen für *CDK4*, sie zeigen jedoch systematische Veränderungen, die für einen Einfluss von c-Myc auf beide Faktoren sprechen.

Das Abschalten von c-Myc führt zu einem Anstieg der *bcl6*-mRNA-Mengen. Werden die Zellen in Medium ohne Tet überführt, steigen die mRNA-Mengen zunächst deutlich weiter an, fallen dann aber nach 24 Stunden auf Mengen ähnlich denen der unbehandelten Kultur. Es ist also eine transiente Induktion und eine langfristige Repression der *bcl6*-Transkription zu erkennen. Auch dieser Effekt ist proliferationsunabhängig.

Für *AID* lagen bereits Ergebnisse aus der Diplomarbeit von S. Tobollik vor, die in diesem Experiment bestätigt werden konnten. Danach hat c-Myc einen intermediär positiven Einfluss auf die *AID*-Level (Zeitpunkt 4 Stunden) führt aber kurzfristig und langfristig zu niedrigeren *AID*-mRNA-Mengen.

E47-mRNA-Level zeigen keine deutlichen Veränderungen innerhalb der Kinetik und beweisen damit, dass die beobachteten Effekte nicht auf behandlungsinduzierte allgemeine Veränderungen der Zellen zurückzuführen sind. Gleiches gilt auch für *E12* und *IgM* (Daten nicht gezeigt).

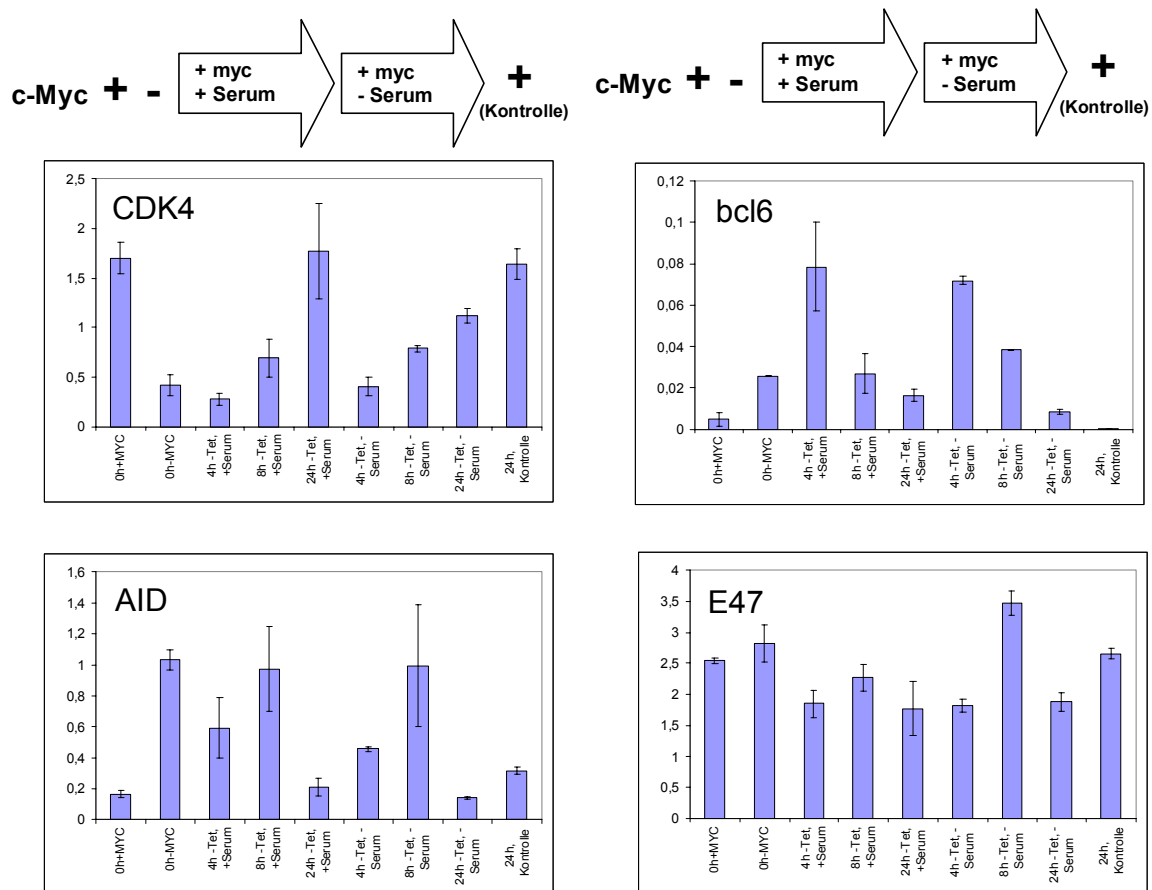


Abbildung 33: Transkriptionelle Beeinflussung der mRNA-Level von AID und bcl6 durch c-Myc in P493.6
P493.6 Zellen wurden für 3 Tage mit Tetrazyklin behandelt (-c-Myc) und bei Versuchsbeginn in frisches Medium mit oder ohne Serum überführt. Nach 4, 8 und 24 Stunden wurden Proben genommen. Außerdem wurden zum Zeitpunkt 0 und nach 24 Stunden aus einer unbehandelten Kultur zwei Positivkontrollen genommen („+“). Eine quantitative RT-PCR-Analyse für die mRNA-Mengen von CDK4, bcl6, AID und E47 wurde durchgeführt und die Ergebnisse als auf ribL23b normalisierte Werte dargestellt.

Um die Langzeiteffekte von c-Myc auf die Keimzentrumsfaktoren zu untersuchen wurden die P493.6 Zellen fünf Tage lang in drei verschiedene Schaltzustände versetzt. Mit Normalmedium proliferieren die Zellen auf dem c-Myc Wachstumsprogramm, unter Zugabe von Tet befinden sie sich in einem Ruhezustand und bei Zugabe von Tetrazyklin und Östrogen proliferieren sie c-Myc-unabhängig auf einem EBV-Wachstumsprogramm.

In Abbildung 34 erkennt man deutlich, dass in der Gegenwart von c-Myc die Proteinlevel von E2A und AID deutlich erhöht sind. Für Bcl6 gelang es leider nicht ein Signal zu erhalten. Sowohl für E2A als auch für AID ist der Effekt auf Proteinebene deutlich stärker ausgeprägt als von den nachgewiesenen Mengen mRNA her zu erwarten wäre.

C-Myc hat also trotz eines schwachen transkriptionellen Effekts auf AID und E2A einen deutlich stärkeren posttranskriptionellen Effekt.

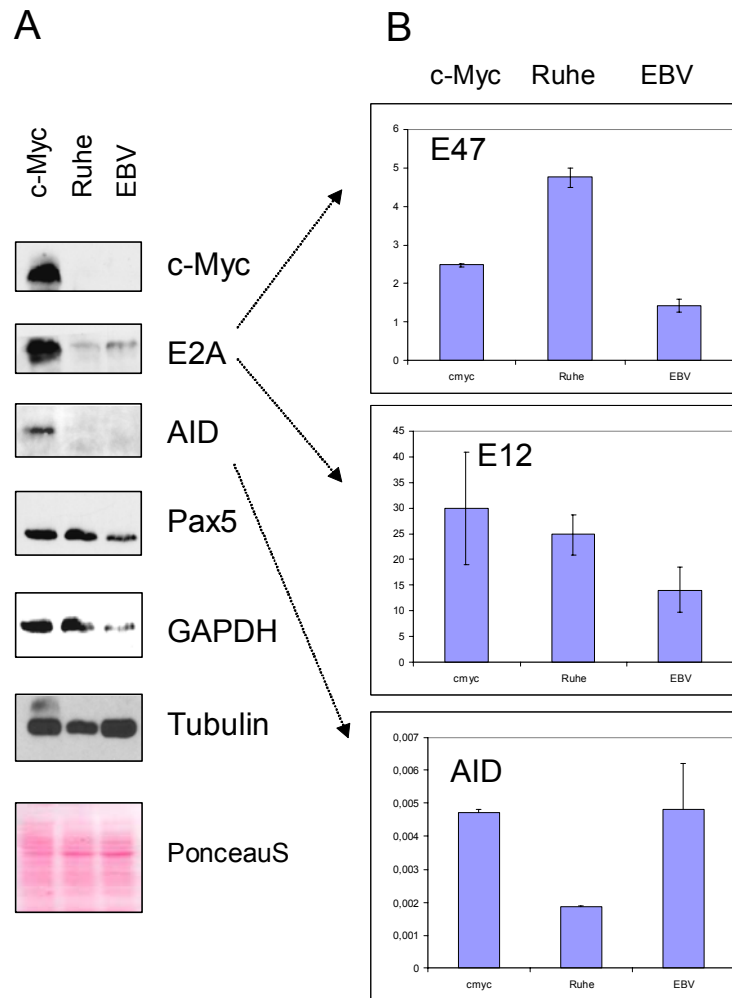


Abbildung 34: Langzeiteffekte von c-Myc auf E2A und AID in P493.6

P493.6 Zellen wurden in Normalmedium kultiviert („cmcy“), mit Tetrazyklin inkubiert („Ruhe“) oder mit Tetrazyklin und Östrogen behandelt („EBV“). Nach fünf Tagen wurden Pellets entnommen. **A)** Proteineextrakte wurde hergestellt und einer Westernblot-Analyse für c-Myc, E2A, AID und Pax5 unterzogen. GAPDH, Tubulin und PonceauS dienen als Ladekontrolle **B)** cDNA wurde in einer quantitativen RT-PCR-Analyse auf AID, E12 und E47 untersucht. Die Werte sind dabei normalisiert auf ribL23B angegeben.

3.7.3 C-Myc beeinflusst Transkriptionsfaktoren in BL-Zelllinien

Die Übertragbarkeit der in P493.6 gewonnenen Erkenntnisse über die Beeinflussung von AID, bcl6 und E2A durch c-Myc wurde mittels des bereits etablierten Myc-Inhibitors (Calbiochem) in BL-Zelllinien überprüft. Dazu wurden die Zellen mit dem Inhibitor inkubiert und für die Zelllinie P493.6 außerdem eine Probe mit Tet versetzt. Nach fünf Tagen wurden die Proben pelletiert und auf ihre mRNA- und Proteinmengen untersucht.

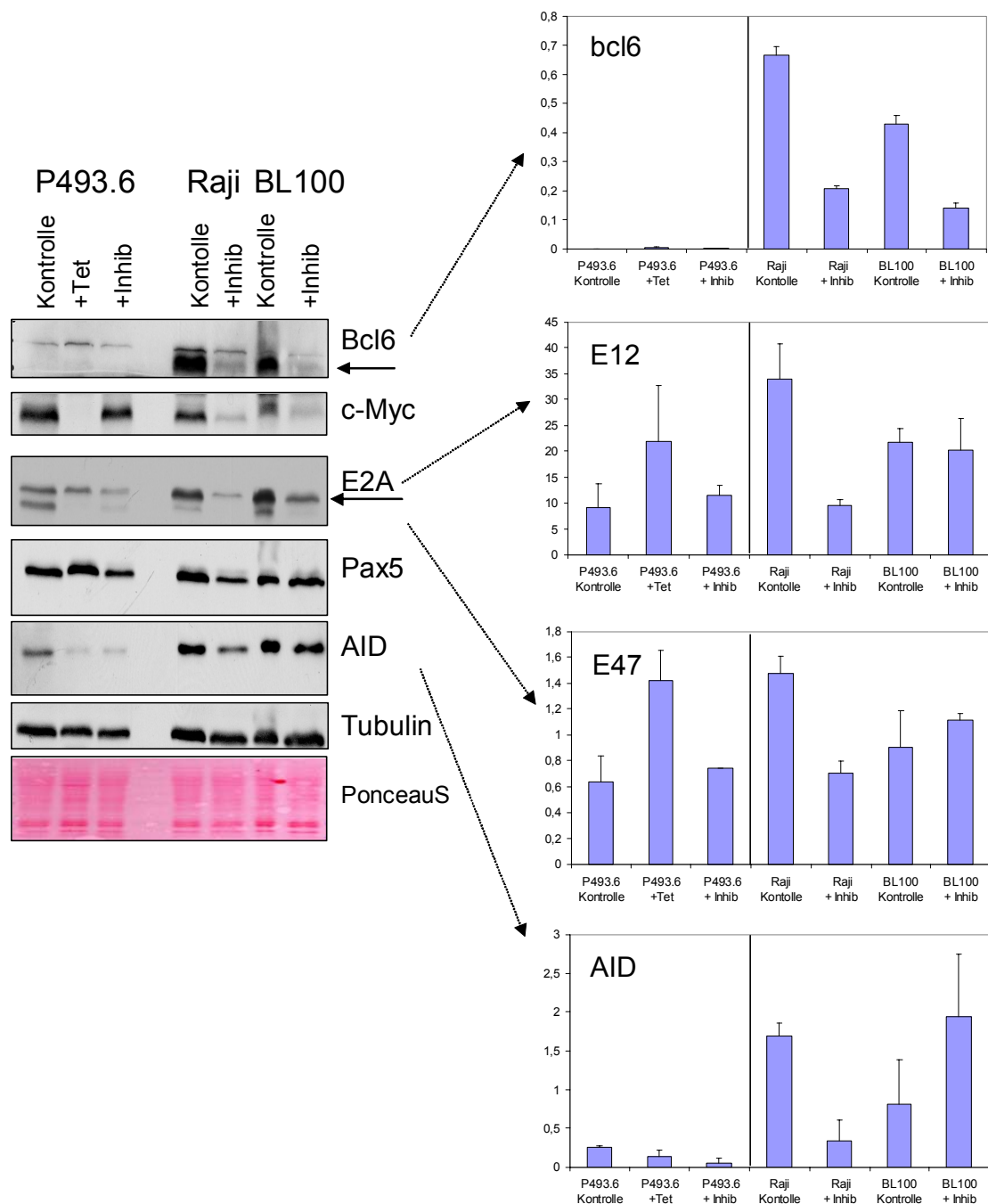


Abbildung 35: Einfluss von c-Myc auf Transkriptionsfaktoren in BL-Zelllinien

Die Zellen wurden für fünf Tage mit 64mM Myc-Inhibitor, die Kontrollproben mit entsprechenden Mengen DMSO inkubiert. Für P493.6 wurde zusätzlich eine Probe mit Tetrazyklin behandelt. Westernblot-Analyse für c-Myc, E2A, Bcl6, AID und Pax5. Tubulin und PonceauS dienen als Ladekontrolle. Quantitative RT-PCR Analyse von AID, bcl6, E12 und E47. Die Werte sind dabei normalisiert auf ribL23B angegeben.

In Abbildung 35 ist zu erkennen, dass in den BL-Zelllinien für bcl6 mRNA und Proteinmengen mit Inhibitor deutlich niedriger sind. Für E2A ist das Bild nicht ganz einheitlich. Zwar zeigen beide getesteten Zelllinien einen deutlichen negativen Effekt auf Proteinebene, aber während dieser in Raji zumindest partiell auch auf mRNA Ebene auftritt, sind für BL100 die mRNA Level für beide Splicingvarianten unverändert. Für AID sind die Proteinmengen ohne Inhibitor leicht höher, auch hier unterscheiden sich jedoch die beiden

BL-Zelllinien deutlich, da es sich in der Raji-Zelllinie um einen transkriptionellen Effekt handeln könnte, nicht jedoch in BL100, wo die mRNA-Level eher eine umgekehrte Tendenz zeigen.

Insgesamt sieht man auf in BL-Zelllinien eine durch c-Myc erhöhte Menge von AID-, Bcl6- und E2A-Protein, die nur teilweise durch transkriptionelle Veränderungen bewirkt wird. Auf mRNA Ebene zeigen sich keine konsistenten Unterschiede.

3.7.4 C-Myc beeinflusst die somatische Hypermutationaktivität

Es wurden verschiedene Versuche unternommen den Einfluss von c-Myc auf die somatische Hypermutation zu untersuchen. Neben den in 3.5 beschriebenen Versuchen der Überexpression wurden aus der Zelllinie BJAB Einzelzellklone mit einem c-Myc-Überexpressionsvektor und als Positivkontrolle einem AID-Überexpressionsvektor generiert. In einem Hypermutationsassay konnte zwar die Überexpression von c-Myc und AID erfolgreich induziert werden, keiner der generierten Klone zeigte jedoch SHM-Aktivität. BJAB ist eine Burkitt-ähnliche Zelllinie, denen sie zwar in vieler Hinsicht ähnelt, ihr fehlt aber die charakteristische *c-myc*-Translokation. Die Zelllinie zeigte zwar in einigen wenigen Fällen Hypermutationsaktivität, aus dem völligen Fehlen von SHM-Aktivität in den getesteten Klonen lässt sich aber kein Rückschluss auf die Rolle von c-Myc ziehen.

Als weitere Möglichkeit wurden Raji-Zellen mit dem Hypermutationsreporter transfiziert und nach Abschluss der Selektion mit verschiedenen Mengen Myc-Inhibitor behandelt. Da c-Myc in Raji-Zellen die Proliferation steuert, wurden exemplarische Zellzählungen und eine kontrollierte identische Behandlung durchgeführt. Daher ist die Zellzahl indikativ für das Wachstum der Zellen über den Zeitraum des Assays. Der sich ergebende Hypermutationsassay (siehe Abbildung 36) zeigt einen deutlichen, dosisabhängigen negativen Effekt des Inhibitors auf die somatische Hypermutation. Die Zellzählungen ergaben ebenfalls einen dosisabhängigen Einfluss des Inhibitors auf die Zelldichte.

Zusammenfassend hat also c-Myc einen Einfluss auf die somatische Hypermutationsaktivität in BL-Zelllinien. Ob dies aber auf Proliferationsunterschiede oder auf die Induktion von AID, E2A und Bcl6 durch c-Myc zurückzuführen ist, lässt sich nicht mit Sicherheit sagen.

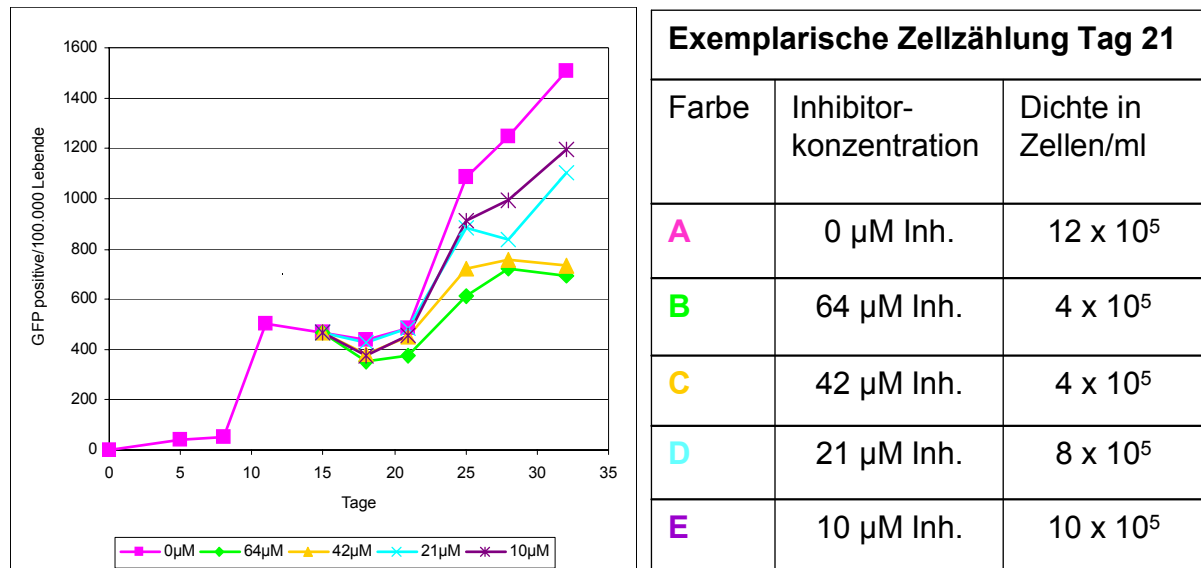


Abbildung 36: Einfluss von c-Myc auf die somatische Hypermuation in der BL-Zelllinie Raji

Raji-Zellen wurden mit dem Hypermuationsreporter transfiziert und nach Abschluss der Selektion an Tag 15 mit den in der Tabelle bezeichneten Konzentrationen des Myc-Inhibitors behandelt. Dargestellt ist der Anteil GFP-positiver Zellen über einen Verlauf von 33 Tagen für die verschiedenen Inhibitorkonzentrationen. Um Proliferationsunterschiede zu ermitteln wurden stichprobenartig Zellzählungen vorgenommen, wie hier für Tag 21 gezeigt.

4 Diskussion

Die somatische Hypermutation ist ein Prozess, dessen Mechanismus mit der Entdeckung von AID 1999 (Muramatsu et al., 1999) erstmal greifbar wurde. Auch wenn damit eine Grundlage zum Verständnis der Affinitätsreifung von Antikörpern geschaffen wurde, bleiben viele Fragen offen. Im Zentrum dieser Fragen steht die komplexe Regulation der SHM, die durch Untersuchungen an AID allein nicht vollständig verstanden werden kann. Auch die verschiedenen Regulationsebenen von AID durch Expression, Kerntranslokation (Brar et al., 2004; McBride et al., 2004; Rada et al., 2002b), Phosphorylierung (McBride et al., 2006) und Degradation (Aoufouchi et al., 2008) lassen viel Raum für Mutmaßungen. Die begrenzte Expression von AID hauptsächlich in B-Zellen (Muto et al., 2000) und die Induktion eines Hypermutationsphänotyps durch Transfektion von AID in nicht-B-Zellen (Okazaki et al., 2002; Petersen-Mahrt et al., 2002; Yoshikawa et al., 2002) sind deutliche Indizien für die Bedeutung der Steuerung von Hypermutation durch Regulation von AID. Durch den Nachweis von Mutationen in nicht-B-Zellen, die im Verlauf von Entzündungsprozessen spontan AID exprimieren, wird diese Annahme noch gestärkt (Endo et al., 2007; Kim et al., 2007a; Matsumoto et al., 2007).

Andere Belege sprechen jedoch dafür, dass weitere Faktoren für die SHM von Bedeutung sind: Bei generalisierter Expression von AID treten nur in wenigen Geweben Tumore auf, was auf die Existenz zusätzlicher gewebespezifischer Faktoren spricht, die für das onkogene Potential wichtig sind (Rucci et al., 2006). Außerdem gelang es nicht in einer prä-B-Zelllinie durch AID-Expression Hypermutation auszulösen (Rückerl und Bachl, 2005) und Zellen sind potentiell in der Lage AID-induzierte Läsionen fehlerfrei zu reparieren, statt sie dauerhaft als Mutationen im Genom zu festigen (Liu et al., 2008a; Poltoratsky et al., 2007). Es müssen also Ebenen der Regulation jenseits von AID existieren. Die Untersuchung von Transkriptionsfaktoren könnte diese Ebene ergänzen, da sie die Transkription der Ig-Gene und von AID beeinflussen, aber auch Rekrutierungsplattformen für AID und mögliche Reparaturkomplexe darstellen könnten. So ist eine Gemeinsamkeit von Zielgenen der Hypermutation in B- und T-Zellen die Präsenz von E47-Bindestellen (Kotani et al., 2005). Die verschiedenen hier untersuchten Transkriptionsfaktoren sind dabei nur die naheliegendsten Startpunkte, nicht jedoch eine vollständige Liste möglicher Kandidaten. Die verwendeten Systeme und entwickelten Ansätze wären jedoch für weitere Untersuchungen nutzbar.

Die Häufigkeit, mit der gerade Transkriptionsfaktoren von fehlgeleiteter Hypermutationsaktivität betroffen sind (Pasqualucci et al., 2001), sowie die Rolle von TF bei

der Entstehung von B-Zelltumoren: Bcl6 in DLCL (Ye et al., 1993), c-Myc in BL (Germann et al., 1983) verweist auf die komplexe Bedeutung dieser Faktoren für die SHM.

4.1 Charakterisierung der Hypermutationsaktivität

Nachdem frühe Untersuchungen der Hypermutation auf der Analyse von Sequenzierungen beruhten (Faili et al., 2002b; Sale und Neuberger, 1998), konnte mit dem Plasmid-basierten Reporterassay von J. Bachl erstmals der Verlauf des Prozesses kontinuierlich untersucht werden (Bachl und Olsson, 1999). Die Durchführung dieser Assays erfolgte bisher an unterschiedlichen Zelllinien aus verschiedenen Organismen und lieferte für einzelne Zelllinien gute Ergebnisse über ihr Hypermutationspotential. Die Charakterisierung eines umfassenden Zellliniensets und damit die Möglichkeit, Korrelationen mit anderen Eigenschaften der untersuchten Zelllinien aufdecken zu können, fehlte jedoch bisher.

Nach Verbesserung des publizierten Assays konnten im Rahmen dieser Arbeit 13 Zelllinien mit dem Hypermutationsassay untersucht werden. Das ist das größte bisher unter vergleichbaren Umständen untersuchte Zelllinienset. Es konnten mit BL100 und Mutu(-) auch erstmals mit diesem Vektorsystem EBV-negative BL-Linien identifiziert werden, die hypermutieren. Dies ermöglicht insbesondere im isogenen Zelllinienset Mutu(-) und MutuIII Rückschlüsse über den Einfluss von EBV auf die Hypermutation. Frühere Arbeiten der Arbeitsgruppe hatten einen hemmenden Einfluss von EBNA2, dem wichtigsten EBV-Transkriptionsfaktor auf AID gezeigt (Tobollik et al., 2006) und dies wird durch die Korrelation von fortdauernder Hypermutation und EBNA2-Status in EBV-positiven Post-Transplantations-Lymphomen (PTL) gestützt (Capello et al., 2003). In BL kommt es zu einer Gegenselektion gegen EBNA2-positive Zellen, weil EBNA2 c-Myc und IgM negativ reguliert (Jochner et al., 1996). In dem untersuchten Zelllinienset zeigt die Zelllinie P3HR1 und deren Subklon HH514 eine Deletion des EBNA2 Gens (Kelly et al., 2002). Insgesamt zeigen im Vergleich der untersuchten Zelllinien EBV-negative Zelllinien jedoch keine höheren Level von Hypermutation. Der Grund hierfür muss jedoch nicht in dem direkten Einfluss von EBV zu suchen sein, sondern könnte ein Resultat der Überlebenswahrscheinlichkeit beim Generieren der Zelllinien sein. Die Immortalisierung durch das EBV-Wachstumsprogramm bietet Zellen vermutlich unabhängig von ihrer SHM-Aktivität bessere Überlebenschancen als anderen Zellen. Wenn EBV-negative Zellen zusätzlich noch hohe Mutationsraten aufweisen kann dies zu einer zusätzlichen Verschlechterung ihrer Überlebenschancen *in vitro* führen. In der Literatur wird sogar die Möglichkeit diskutiert, dass EBV-positive und -negative Burkitt-Lymphome sich in ihrem zellulären Ursprung unterscheiden (Bellan et al., 2005).

Allerdings zeigten die Zellen in dieser Studie keine fortdauernde Hypermuation, sondern wurden anhand der bereits akkumulierten Mutationen beurteilt.

Im Zelllinienset korreliert der EBV-Status insgesamt nicht mit der gemessenen SHM-Aktivität. Eine Möglichkeit, den Einfluß von EBV genauer zu untersuchen bietet sich allerdings durch die Identifikation EBV-negativer hypermutierender Zelllinien, in denen durch *in vitro* Infektion, möglicherweise auch im Vergleich mit Wildtyp-Viren versus EBNA2-defizienten Stämmen, der Einfluss von EBV beziehungsweise der von LMP1 oder LMP2a einem isogenen System überprüft werden könnte.

Im Rahmen verschiedener Studien (Bachl et al., 2001; Kelly et al., 2002; Storb et al., 1998) konnte der positive Einfluss von Enhancern auf die Hypermuation gezeigt werden. Dies bestätigte sich auch in drei der hier untersuchten Zelllinien (Raji, BL60, Mutu(-)). Eine weitere Zelllinie (BL100) zeigte eine unveränderte Hypermuationsaktivität auch ohne Enhancer, allerdings bei insgesamt niedriger Hypermuationsaktivität. Ein möglicher Effekt von Enhancern ist die Beeinflussung der Transkription. Dies konnte hier nicht bestätigt werden. Die durchschnittliche Fluoreszenz grüner Zellen war unabhängig von der Präsenz der Enhancer in den Zellen etwa gleich (Daten nicht gezeigt). Allerdings ist unklar wie hoch die Sensitivität dieser Messung ist. Für genauere Aussagen wäre eine Analyse beispielsweise über quantitative Lightcycler-PCR der GFP-mRNA zu empfehlen.

Besonders interessant waren die großen Unterschiede in der Hypermuationsaktivität zwischen verschiedenen Batchkulturen derselben Zelllinie. Diese Unterschiede stellen die Vergleichbarkeit von Ergebnissen unabhängiger Assays in Frage und machen eine gründliche Kontrolle der Rahmenbedingungen erforderlich. So sollten Assays nur mit möglichst frisch aufgetauten Zellen durchgeführt werden, da lange Kultivierungszeiträume sich negativ auf die SHM-Aktivität auswirken (Rückerl et al., 2004; Zhang et al., 2001). Beim Vergleich von verschiedenen Behandlungen der Zellen wie z.B. der Transfektion mit RNAi-Vektoren sollte es sich bei der Ausgangspopulation für alle Bedingungen um einen einheitlichen Batch handeln. Die hohe Plastizität von Batchkulturen wird zumindest teilweise durch die hohe Heterogenität der Zellen in diesen Kulturen erklärt. Diese zeigt sich bei der Analyse von EZK, die im Rahmen dieser Arbeit für verschiedene Zelllinien generiert wurden. Die Klone unterschieden sich in der AID-Expression, der Expression der untersuchten Transkriptionsfaktoren und der Hypermuationsaktivität (in Abbildung 8 und Abbildung 14 für BL100 und Raji gezeigt). Generierte EZK wurden außerdem im Rahmen zweier Diplomarbeiten unseres Labors eingehender untersucht. Im Rahmen der Diplomarbeit von K. Pinczesi wurde eine hohe klonale Heterogenität für die Expression von Reparaturfaktoren in vier verschiedenen hypermutierenden Zelllinien gezeigt, was bedeuten könnte, dass nicht nur

die Zahl der durch AID eingeführten Läsionen, sondern auch ihre fehlerhafte Reparatur zwischen Klonen differieren. Die interklonale Heterogenität ist dabei anscheinend kein direkter Nebeneffekt der fortdauernden Hypermutation, da sie auch in nicht-hypermutierenden Zelllinien im Rahmen der Diplomarbeit von J. Unterlehberg nachgewiesen werden konnte.

Die Veränderung der Zelllinien in Kultur spiegelt sich dabei auch im untersuchten Zelllinienset wieder. So unterscheidet sich die Zelllinie P3HR1, ursprünglich ein Zellklon der Zelllinie Jijoye, von dieser durch ein EBV-Genom ohne funktionales EBNA2 sowie eine Mutation im *c-myc*-Gen, die zur erhöhten Stabilität des Proteins führt. HH514, ein Klon der Zelllinie P3HR1, unterscheidet sich wiederum durch den Verlust von funktionellem p53 von der Ursprungszelllinie (K. Braunschmidt, persönliche Mitteilung). Vor diesem Hintergrund wird deutlich, warum für Experimente mit Batch-Kulturen eine gründliche Kontrolle notwendig ist und warum die Durchführung in Einzelzellklonen reproduzierbarere Ergebnisse liefert.

Ein Versuch, Ergebnisse verschiedener Assays oder verschiedener Transfektionen in einem Assay besser vergleichen zu können, ist das Ermitteln der Kopienzahl des Hypermutationsreporters. Hierfür werden während des Hypermutationsassays Proben entnommen und die Zahl der CMV-Promotorsequenzen des Vektors pro genomischer HPRT-Sequenz (X-chromosomal, daher zusätzliche Halbierung der ermittelten Werte bei einem weiblichen Ursprung der Zelllinie) berechnet. Der ermittelte Wert gibt Auskunft über die Zahl der Vektorkopien pro Zelle und ermöglicht damit ein Normalisieren der Mutationswahrscheinlichkeit auf die Vektoranzahl. Mehrfache Messungen über den Verlauf des Assays zeigten ein starkes Absinken der Vektorkopienzahl von über 25 auf 1-2 Kopien am Ende (Tag 30-35) eines Assays (M Mierau, Doktorarbeit). Die Normalisierung der gesamten Graphen auf die Kopienzahl zu einem bestimmten Zeitpunkt des Assays, oder eine gemittelte Kopienzahl ist damit eher Ausdruck der Kinetik von Selektion und Plasmidverlust, und der Endpunkt eines Graphen gibt einen ausreichenden Hinweis auf die Zahl der grünen Zellen bei nur noch etwa einer Kopie. Deshalb wurde in dieser Arbeit vom Normalisieren der Graphen auf Kopienzahlen abgesehen und stattdessen eine möglichst homogene Behandlung aller zu vergleichenden Kulturen in Bezug auf Ausgangsbatche, Fütterung, Behandlungsintervalle usw. angestrebt. Der quantitative Vergleich von Hypermutation bleibt jedoch insbesondere zwischen unterschiedlichen Zelllinien schwierig, weshalb die Charakterisierung der Zelllinien nur zu einer Einstufung als hypermutierend versus nicht-hypermutierend führte und nicht zu einer graduellen Abstufung von

Hypermutationsaktivitäten. Die Raji-Zelllinie wies im Vergleich jedoch bis zu zehnmal mehr grüne Zellen auf als andere hypermutierende Zellen.

Die Charakterisierung des Zellliniensets ermöglichte die Überprüfung einer für eine geringere Zahl von Zelllinien aufgestellte Hypothese über einen Zusammenhang der SHM-Aktivität mit der Oberflächenexpression von CD77, einem Zentroblastenmarker (S. Tobollik, Diplomarbeit). Tatsächlich bestätigte sich für die meisten Zelllinien dieser Zusammenhang. Dies könnte bedeuten, dass Faktoren, die für den Zentroblastenphänotyp verantwortlich sind, auch für die Regulation der SHM eine wichtige Rolle spielen. Da die SHM in ihrer Aktivität und in der Zielführung maßgeblich durch Transkriptionsfaktoren beeinflusst wird, sind möglicherweise dieselben TF an der Regulation der CD77-Expression beteiligt.

Die Korrelation von fortdauernder Hypermutationsaktivität und CD77 ist auch deshalb interessant, weil dieser Zusammenhang damit erstmals direkt untersucht wurde. Die Färbungen und Sortierungsansätze, die bisher für die Untersuchung von Zentroblasten verwendet wurden, konnten nur indirekt über die Expression von Genen der Hypermutationsregulation Aussagen hierüber machen (Cattoretti et al., 2006b; Hogerkorp und Borrebaeck, 2006; Liu und Arpin, 1997; Nakayama et al., 2006)

In jüngerer Zeit wurde zwar die Möglichkeit einer stringenten Unterscheidung von Zentrozyten und Zentroblasten durch den Nachweis einer hohen Mobilität der aktivierten B-Zellen im Keimzentrum in Frage gestellt (Schwickert et al., 2007), andererseits führten Sortierungen von B-Zellen zur Isolation einer homogenen CD77-positiven Population, die sich durch hohe AID-Expression und Proliferation auszeichnete, wie es für Zentroblasten beschrieben wurde. Lediglich die CD77-negative potentielle Zentrozytenfraktion erschien heterogen und wies ein teilweise intermediäres Transkriptionsprogramm zwischen Zentroblasten und Plasmazellen auf (Hogerkorp und Borrebaeck, 2006).

Die Untersuchung von Lymphomzelllinien, die im Zellstadium der Ursprungszelle quasi arretiert ist, kann hier also möglicherweise Hinweise auf die Korrelation von Oberflächenmarkern und fortdauernden Prozessen liefern, auch wenn dabei die mögliche Einwirkung der onkogenen Transformation in diesem Fall von c-Myc berücksichtigt werden muß (siehe 4.3.3.2)

4.2 Korrelation der Expression von Transkriptionsfaktoren mit der Hypermutationsaktivität verschiedener Zelllinien

In verschiedenen Zelllinien wurde die Expression von bcl6, c-myc, E2A und pax5 auf RNA- und Proteinebene untersucht. Für keinen der Transkriptionsfaktoren war eine eindeutige Korrelation mit der SHM-Aktivität der Zellen zu beobachten. Pax5 war im Schnitt in nicht-

hypermutierenden Zellen genauso stark exprimiert wie in hypermutierenden. Dies gilt sowohl auf RNA- wie auf Proteinebene. Obwohl eine Rolle von Pax5 für die AID-Expression beschrieben wurde (Gonda et al., 2003), ist für das untersuchte Zelllinienset keine Korrelation dieser beiden Faktoren sichtbar. Für E2A ist die Interpretation etwas komplexer, weil die mRNA-Level für die beiden Splicingvarianten ermittelt wurden, während der Antikörper die Gesamtmenge beider Varianten detektiert. Zwar sind große Unterschiede in den Proteinleveln zu verzeichnen, auch hier ist jedoch keine Korrelation mit AID erkennbar.

Für c-Myc zeigen die nicht-hypermutierenden Zelllinien im Schnitt etwas höhere mRNA-Mengen als die hypermutierenden, mit Ausnahme von HH514. Auf Proteinebene ist kein Unterschied zwischen den beiden Gruppen sichtbar. Die Zelllinien mit einem aktiven EBV-Wachstumsprogram zeigen insgesamt niedrigere Mengen c-Myc. Trotz des Vorliegens einer *c-myc*-Translokation in den Burkitt-Lymphom-Zelllinien, führt diese anscheinend nicht zu einer deutlichen Erhöhung der RNA oder Proteinmenge von c-Myc wie man am Vergleich von Nalm6 oder BJAB mit BL100 und Raji erkennen kann. Es ist aber möglich, dass sich durch Mutationen, die für einige der Zelllinien nachgewiesen wurden (Gregory und Hann, 2000), die Stabilität oder auch die Aktivität des exprimierten Proteins oder dessen Erkennung durch den Antikörper verändert haben könnte. Bcl6 ist der einzige Faktor, der auf RNA-Ebene in hypermutierenden Zellen im Schnitt höher exprimiert ist, allerdings nur, weil in der Gruppe der nicht-hypermutierenden Zelllinien auch Zelllinien berücksichtigt sind, die aus pro-B-Zellen bzw. naiven Zellen isoliert wurden. Einzig MutuIII zeigt trotz SHM-Aktivität keine Expression von Bcl6. Die Proteinmengen zeigen dieselben Tendenzen. Für Bcl6 ist bisher kein direkter Einfluss auf AID oder die Transkription von Ig-Genen nachgewiesen. Die Bedeutung für die Keimzentrumsreaktion liegt eher in der Fixierung der Zelldifferenzierung, da *bcl6*-defiziente Zellen ohne nachweisbare somatische Hypermutation durchzuführen zu Gedächtnis-, aber weniger zu Plasmazellen weiterdifferenzieren (Toyama et al., 2002). Es ist jedoch bekannt, dass eines der wichtigsten Targetgene von Bcl6 *blimp-1* (*PRDM*) ist, welches zentral die Plasmazelldifferenzierung steuert und dabei auch *AID* negativ reguliert (Shaffer et al., 2002a). Auf diese Weise könnte *bcl6* indirekt einen Einfluss auf AID haben. Eine Korrelation zwischen Bcl6 und AID im Vergleich der Zelllinien war jedoch nicht nachweisbar.

Insgesamt war die Expression von AID (auf RNA und Proteinebene) am besten mit der somatischen Hypermutationsaktivität korreliert. Dies ist nicht überraschend, da die AID-Expression eine notwendige Voraussetzung für die SHM ist.

4.3 Manipulation von Transkriptionsfaktoren in hypermutierenden Zelllinien

4.3.1 Experimentelle Ansätze zur Manipulation

Um die Vorteile und Nachteile des verwendeten experimentellen Ansatzes diskutieren zu können, soll zuerst auf bereits publizierte Ansätze zu Effekten der Transkriptionsfaktoren eingegangen werden. In der Literatur sind *knockout*-Mausstudien für *E2A* (Bain et al., 1994; Zhuang et al., 1994), *pax5* (Horowitz et al., 2004) und *bcl6* (Toyama et al., 2002) beschrieben, aber da diese Faktoren die B-Zelldifferenzierung beeinflussen, führt der *knockout* zu einem Block der B-Zellentwicklung vor dem reifen B-Zell-Stadium, beziehungsweise zu einer beschleunigten Differenzierung von naiven B-Zellen zu Gedächtniszellen. Der *knockout* von *c-myc* ist embryonal lethal (Davis et al., 1993). Ein direkter Einfluss auf den Prozess der Hypermutation kann in diesen Modellen nicht untersucht werden.

Für einige Faktoren wurden zusätzlich konditionale *knockout*-Modelle verwendet. Dabei werden kritische Regionen des entsprechenden Gens mit loxP-Stellen flankiert und eine Cre-Rekombinase unter Kontrolle eines gewebespezifischen Promotors eingekreuzt, so dass die Expression der Cre-Rekombinase gewebespezifisch zu einer Deletion des Gens führt. Für Untersuchungen im Keimzentrum wurden dabei die Promotoren des Immunglobulins $\gamma 1$ oder von AID verwendet (Casola et al., 2006). Für c-Myc wurden vor allem versucht die Deregulation des Gens durch Translokation in den Immunglobulinlocus nachzubilden um ein Mausmodell für Burkitt-Lymphome zur Verfügung zu haben. Bisher führte jedoch keiner der verwendeten Ansätze zur Entstehung von Lymphomen mit einem Keimzentrumphänotyp, sondern wies entweder Eigenschaften unreifer B-Zellen oder von Plasmazellen auf (Kovalchuk et al., 2000; Park et al., 2005; Yan et al., 2007). Es konnte jedoch ein möglicher Beitrag von AID an der Entstehung verschiedener Lymphomtypen gezeigt werden (Kotani et al., 2007; Pasqualucci et al., 2008).

Für E2A konnten durch konditionale *knockouts* mit verschiedenen Faktoren eine Rolle von E2A für die pro- und prä B-Zellentwicklung, aber auch eine für die Keimzentrumentwicklung gezeigt werden. Interessanterweise war die Expression von AID im Keimzentrum in diesen Mäusen unverändert, so dass die Rolle von E2A weniger in der Regulation von AID als möglicherweise bei der Beeinflussung anderer Transkriptionsfaktoren zu suchen ist. Insbesondere Pax5 ist hierfür ein möglicher Kandidat, weil dessen ektopische E2A-unabhängige Expression die Defizienz zumindest teilweise ausgleichen konnte (Kwon et al.,

2008). Der konditionale *knockout* von *pax5* führte zu einer Dedifferenzierung der Zellen bis zurück zu T-Zellen (Cobaleda und Busslinger, 2008).

Keines dieser Modelle erlaubt die Untersuchung des Hypermutationsprozesses, da sie nach einer vollständigen Entfernung von Transkriptionsfaktoren mit Einfluss auf die Differenzierung meist keine untersuchbare Keimzentrumszellpopulation aufweisen.

Deshalb sind alternative Verfahren wie *knockdown* oder Inhibitoren für die negative Manipulationen besser geeignet. Solche Ansätze wurden für c-Myc und Bcl6 besonders intensiv untersucht, weil Eingriffe zur negativen Regulation bei der Behandlung von Lymphomen Anwendung finden könnten. Für Bcl6 gibt es einen spezifischen Inhibitor (Polo et al., 2004; Prive und Melnick, 2006), dominant-negative Konstrukte (Baron et al., 2002) und siRNA-*knockdown* (Baron et al., 2007; Perez-Rosado et al., 2008). In keinem dieser Experimente wurde jedoch AID oder SHM untersucht. Für c-Myc existieren mehrere unabhängig entwickelte Inhibitoren (Kiessling et al., 2006; Wang et al., 2007), die aber hauptsächlich auf Proliferaion und Zellzykluseffekte untersucht wurden und hierfür unter anderem in einer BL-Zelllinie angewendet wurden (Sampson et al., 2007). Auch hier wurden jedoch AID oder somatische Hypermutation nicht analysiert. RNAi-Ansätze wurden für c-Myc bereits beschrieben (Wang et al., 2005), könnten in BL-Zellen aufgrund deren Abhängigkeit von hoher c-Myc-Expression für die Proliferation aber erschwert sein. Der *knockdown* von Pax5 mittels lentiviraler Transfektion wurde nicht auf Aspekte der Affinitätsreifung untersucht (Cozma et al., 2007). Für E2A existieren keine Veröffentlichungen über RNA-Interferenz Experimente trotz kommerziell erhältlicher siRNAs gegen E2A, es liegen aber Ergebnisse über einen *knockout* von E2A in der Hühner-B-Zelllinie DT40 vor, in der ein positiver Einfluss von E12 und E47 auf die somatische Hypermutation durch Rekonstitution nachgewiesen werden konnte (Schoetz et al., 2006).

Es existieren für alle Transkriptionsfaktoren Überexpressionanalysen, die für *c-myc*, *pax5* und *bcl6* zur Identifizierung von Targetgenen besonders im Zusammenhang mit der Lymphomentstehung durchgeführt wurden (*pax5* (Pridans et al., 2008); *bcl6* (A. Melnick nicht veröffentlicht laut (Ranuncolo et al., 2007); *c-myc* (Schuhmacher et al., 2001)). In den meisten Fällen handelte es sich dabei um konstitutiv exprimierende Vektoren, so dass das Maß der Überexpression nicht moduliert werden konnte. Lediglich für c-Myc wurden extensive Experimente mit einen induzierbaren Vektor durchgeführt (Kim et al., 2007b; Li et al., 2005; Liu et al., 2008b; Mezquita et al., 2005; Schlosser et al., 2005), allerdings wurden keine Effekte auf AID oder SHM untersucht und das untersuchte Zellsystem basiert auf nicht mutierenden naiven B-Zellen (Schuhmacher et al., 2001).

E2A ist der einzige Transkriptionsfaktor, für den bisher der Einfluss auf fortdauernde Hypermutation untersucht und beschrieben wurde (Schoetz et al., 2006). Für die anderen Transkriptionsfaktoren fehlen solche Ansätze vollständig.

Es liegen also prinzipiell Daten über die Überexpression und für den zum Teil auch konditionalen *knockout* der Transkriptionsfaktoren vor, es fehlen jedoch Untersuchungen der Effekte auf AID und somatische Hypermutation, und die meisten der bisher verwendeten Ansätze erlauben keine Modulation der Überexpression. Der Ansatz dieser Arbeit, Doxycyclin-regulierbare Überexpression und siRNA-vermitteltes Silencing mit einem Hypermutationsreporter zu kombinieren, sollte das Schließen dieser Lücke erlauben.

Allerdings traten bei der Durchführung verschiedene Probleme auf, die erst durch eine Weiterentwicklung des ursprünglichen Ansatzes zu aussagekräftigen Ergebnissen führten. Nach einer aufwändigen Klonierung der Überexpressionsvektoren lagen Plasmide zur Überexpression von Bcl6, c-Myc und Pax5 sowie Luciferase als Negativ- und AID als Positivkontrolle vor. Im Fall von E12 war die Klonierung möglicherweise nicht erfolgreich, weil das endgültige Konstrukt bei nachträglichen Kontrollen Mutationen aufwies, welche die Funktion des Proteins beeinträchtigt oder zerstört haben könnten. Die Anwendung aller vier Überexpressionsvektoren in verschiedenen Zelllinien zeigte eine gute Überexpressionseffizienz und das verwendete pRTS-Vektorsystem erlaubte eine Modulation der Überexpression (Bornkamm et al., 2005). Mit diesem System konnte für Bcl6 und c-Myc ein positiver Effekt auf AID gezeigt werden (siehe unten). Versuche, Zelllinien simultan mit den Überexpressionsvektoren und einem Hypermutationsrepoter zu transfizieren, scheiterten jedoch an der für den Versuch notwendigen Doppelselektion der Zellen.

Erst die Etablierung von Einzelzellklonen für die Überexpression der einzelnen Vektoren ermöglichte die Durchführung von Hypermutationsassays. Die Verwendung von Einzelzellklonen ist einerseits mit einer Verbesserung der Reproduzierbarkeit durch geringere Plastizität/Heterogenität der untersuchten Zellen verbunden, andererseits beschränkt der damit verbundene Aufwand die Anwendung auf nur eine Zelllinie.

Der alternative Versuchsansatz der negativen Regulation der Transkriptionsfaktoren durch siRNA erwies sich zwar trotz gegenteiliger Berichte (Oberdoerffer et al., 2005) als möglich, auch wenn frühere Versuche der Arbeitsgruppe unterschiedliche Effizienzen der Hemmung ergeben hatten (T. Thiel, Diplomarbeit). Damals waren die Effekte jedoch ausschließlich auf mRNA-Ebene untersucht worden, womit translationale Effekte der RNA-Interferenz nicht berücksichtigt werden konnten. Eine Verbesserung der Aufreinigung der mit den shRNA-Vektoren transfizierten Zellen führte zu einer höheren Ausbeute an Zellen, die eine zusätzliche Proteinexpressionsanalyse erlaubte. Allerdings war die Anwendung der siRNA

nur für einen begrenzten Zeitraum möglich, da die Zellen danach in Apoptose übergangen. Ein Grund hierfür ist wahrscheinlich die durch RNA-Interferenz ausgelöste Interferonantwort (Reynolds et al., 2006). Zwar wurde für alle verwendeten shRNA-Vektoren die Interferoninduktion durch mRNA-Analysen des Zielgens *OAS1* überprüft und es zeigten sich für keinen bestimmten Faktor oder Vektor eine erhöhte Aktivierung nach drei Tagen (Daten nicht gezeigt), aber über längere Zeiträume werden offensichtlich auch geringe Interferoninduktionen von den Zellen nicht toleriert.

Für c-Myc wurden außerdem zwei verschiedene Inhibitoren getestet. Dabei konnte nur für einen der Inhibitoren eine Funktionalität nachgewiesen werden, so dass nur dieser für die dargestellten Experimente berücksichtigt wurde.

Insgesamt wurde also ein regulierbares Überexpressionssystem verwendet, das im Kontext von Einzelzellklonen auch mit einem Hypermutationsreporter kombiniert werden kann und ein RNA-Interferenzsystem, das allerdings nicht mit einer Untersuchung der Hypermutation zusammen angewendet werden kann. Deshalb wurde die Analyse für einen der Faktoren exemplarisch um Inhibitorversuche ergänzt wurde, die eine solche Kombination zulassen.

4.3.2 Überexpression der Transkriptionsfaktoren

In verschiedenen Zelllinien konnte eine deutlich Überexpression des jeweiligen Transkriptionsfaktors für alle Überexpressionvektoren nachgewiesen werden, auch für E2A, obwohl hier nachträglich nicht sicher ist, ob es sich um ein funktionelles Protein handelt.

Für die Untersuchung von Effekten der Überexpression auf AID wurde das Versuchsprotokoll verkürzt und standardisiert, so dass eine parallele Transfektion aller Transkriptionsfaktoren möglich war. In den anschließenden Proteinanalysen ergaben sich erneut gute Überexpressionseffizienzen für E2A, Pax5 und technisch schwerer interpretierbar wohl auch für Bcl6. Der Bcl6-Antikörper zeigte eine insgesamt niedrige Sensitivität und auch Optimierungsversuche und Tests alternativer Antikörper erlaubten keine Verbesserung. Einzig die Überexpression von c-Myc war nur schwach ausgeprägt, was ein möglicher Hinweis auf eine Gegenregulation in den Zellen oder eine Selektion auf nicht- oder schwach-überexprimierende Zellen sein kann, da starke Überexpression sowohl zu erhöhter Proliferation als auch zu Apoptose führen kann (Prendergast, 1999).

Trotz der nur schwachen Überexpression von c-Myc war ein positiver Effekt auf AID in einem Teil der Zelllinien sichtbar. Dieser Zusammenhang wurde bisher noch nicht beschrieben und könnte trotz möglicher indirekter Effekten von c-Myc auf Proliferation oder Überleben auch auf eine Rolle von c-Myc für die fortdauernde Hypermutation in BL hindeuten. Interessanterweise führte auch die Überexpression von Bcl6 zu höheren AID

Proteinmengen. Ein direkter Zusammenhang zwischen Bcl6 und AID war bisher ebenfalls nicht bekannt. Auch ist Bcl6 ein Repressor, so dass es sich hier um einen indirekten Effekt handeln könnte, zumal keine Bcl6-Bindestelle im *AID*-Gen identifiziert wurde. Für eine indirekte Regulation von Bcl6 auf AID sind neben einer möglichen Beeinflussung über Blimp1 auch Interaktionen von Bcl6 mit anderen Transkriptionsfaktoren, wie es beispielsweise für Miz-1 beschrieben wurde (Phan et al., 2005), möglich. Bekannt sind allerdings Effekte von Bcl6 auf p21 und ATR, also zwei zentrale Moleküle der DNA-Reparatursignalwege (Phan et al., 2005; Ranuncolo et al., 2007) und eine Regulation von Bcl6 durch genotoxischen Stress mittels ATM (Phan et al., 2007). Es ist also möglich, dass Bcl6 durch AID-induzierte Läsionen negativ reguliert wird.

Pax5 und E2A zeigten keine Effekte der Überexpression auf AID. Dies ist überraschend, da E-Boxen im *AID*-Gen eine Regulation nahe legen. Andererseits waren auch bei unveränderten AID-Leveln Effekte von E2A-Überexpression auf die SHM zu beobachten (Schoetz et al., 2006). Allerdings diversifizieren diese Zellen ihre Immunglobulingene durch Genkonversion und nur in Ausnahmen durch somatische Hypermutation, so dass Unterschiede in der Regulation möglich sind, und außerdem handelte es sich um ein *AID*-Transgen, dem regulative Elemente des endogenen Locus fehlen. Da E2A einen Effekt auf die Histonacetylierung aufweist (Kitao et al., 2008), ist auch nicht auszuschließen, dass diese in den untersuchten hypermutierenden Zellen bereits erfolgt war und mit zusätzlich exprimiertem E2A keine Steigerung dieser Reaktion mehr möglich ist. Eine andere potentielle Ursache für den fehlenden Effekt wären die bereits erwähnten Mutationen im Überexpressionvektor. Für Pax5 lagen Ergebnisse aus *EMSA/Gelshift*-Assays vor, die eine Bindung im AID-Locus nachwiesen und eine Regulation der Expression durch Id2 als wichtigstem Gegenspieler von Pax5 in B-Zellen zeigten (Gonda et al., 2003). Es ist allerdings möglich, dass die Mengen von Pax5 in den untersuchten Zelllinien bereits hoch genug sind um eine Bindung im AID-Locus zu erreichen und eine Sättigung dieser Regulationsmöglichkeit keine Verstärkung der AID Expression mehr zulässt.

In weiteren Versuchen wurde versucht, die Effekte der Überexpression der Transkriptionsfaktoren auch in Einzelzellklonen zu zeigen. Trotz erfolgreicher Überexpression und der Etablierung einer sehr effektiven Methode zur Aufreinigung der überexprimierenden Zellen gelang es nicht konsistente Effekte für irgendeinen der Transkriptionsfaktoren nachzuweisen. Da wie bereits erwähnt auch ohne Veränderung der AID-Level Effekte auf die Hypermutation auftreten können (allerdings untersucht für den endogenen Ig-Locus (Schoetz et al., 2006)), wurde trotzdem in Hypermutationsassays ein möglicher Einfluss der Transkriptionsfaktoren untersucht. Auch hier zeigte sich kein Effekt

für verschiedene Überexpressionslevel und Einzelzellklone. Die Ursache hierfür war nicht in Problemen mit der Überexpression innerhalb des Assays zu finden, wie Proteinanalysen während und nach Abschluss des Hypermutationsassays zeigten. Auch zeigten Experimente mit AID-Überexpression als Positivkontrolle dosis-abhängige positive Effekte auf die Hypermutation, die beweisen, dass die Sensitivität des Assays zur Detektion solcher Effekte geeignet ist.

Es stellt sich also die Frage, warum die in Batchkulturen nachgewiesenen Effekte in Einzelzellklonen nicht auftraten. Ein Erklärungsansatz hierfür ist die Heterogenität der Batchkulturen im Vergleich mit den Einzelzellklonen. Es ist nicht auszuschließen, dass Effekte in Batchkulturen auf Veränderungen in einer Subpopulation zurückzuführen sind, die in den Einzelzellklonen eventuell nicht repräsentiert wird. Hinweise auf Veränderungen der Zellpopulation im Verlauf eines Assays konnten bereits früher gezeigt werden (K. Pinczesi, Diplomarbeit) und auch ein Selektionseffekt ist nicht auszuschließen.

Wegen der Diskrepanz der Ergebnisse der Überexpression in den Batchkulturen versus den Einzelzellklonen ist eine unabhängige Bestätigung der Effekte umso wichtiger.

4.3.3 Herunterregulation der Transkriptionsfaktoren

Um Effekte der negativen Regulation der Transkriptionsfaktoren zu untersuchen und dabei die Effekte der Überexpression zu bestätigen wurden sowohl RNA-Interferenz als auch im Fall von c-Myc die Verwendung spezifischer Inhibitoren als Methode herangezogen.

4.3.3.1 RNAi in hypermutierenden Zelllinien

Ein vektorbasiertes RNAi-System war für die Anwendung in BL-Zelllinien getestet worden und für E2A, Pax5 und c-Myc lagen außerdem bereits Vektoren vor (T. Thiel, Diplomarbeit und B. Jungnickel). Ein Test dieser und dreier neuer gegen Bcl6 gerichteter Vektoren ergab sehr unterschiedliche Effizienzen für die negative Regulation der mRNA der Transkriptionsfaktoren. Der Grund hierfür ist vermutlich, dass nur ein Teilaspekt der RNA-Interferenz in diesem Experiment erfasst wird, nämlich die Spaltung der mRNA, während zusätzliche Effekte durch z.B. Translationsinhibition unberücksichtigt bleiben. Deshalb wurden im Folgenden auch Analysen der Proteinlevel durchgeführt. Hier zeigte sich ein deutliches Absinken der Proteinmengen für E2A, Pax5 und Bcl6. Nur für c-Myc war die Effizienz nach wie vor niedrig.

Auf RNA-Ebene zeigte sich ein negativer Effekt der siRNA gegen bcl6 und E2A auf die mRNA Level von AID. Die Proteindaten zeigten einen schwachen negativen Effekt für RNAi gegen alle Faktoren, am deutlichsten ausgeprägt für E2A und zwei der drei Bcl.6 siRNAs.

Interessanterweise zeigt sich auch für zwei der gegen c-Myc gerichteten Vektoren ein schwacher, negativer Effekt auf AID.

Damit gelang es mittels der RNA-Interferenz-Methode die Überexpressionsergebnisse für Bcl6 und C-Myc unabhängig zu bestätigen. Eine Überprüfung der *blimp1*-Expression ergab keine Erhöhung der mRNA-Mengen. Es ist also möglich, dass der Effekt von Bcl6 auf AID unabhängig von *blimp1* erfolgt (Daten nicht gezeigt). Damit wurde ein neuer Faktor der Regulation von AID identifiziert, auch wenn die Expression von AID allein noch keine Aussage über die Relevanz für die somatische Hypermutation erlaubt. Dies könnte eventuell durch die Verwendung des publizierten Bcl6-Inhibitors in einem Hypermutationsassay näher untersucht werden.

Im Rahmen der normalen Keimzentrumsentwicklung könnte die positive Regulation von AID durch *bcl6* die Koordination von Hypermutation und Keimzentrumsreaktion fördern. Insbesondere beim Verlassen des Keimzentrums könnte dies zu einer Beschleunigung oder Verbesserung der Herunterregulation von AID führen, da Bcl6 dann sowohl einen direkten Effekt auf AID ausübt, als auch durch Nachlassen der Repression von *blimp1* einen indirekten Einfluss auf die negative Regulation von AID ausübt. Außerdem könnte die Deregulation von Bcl6 damit einen Beitrag zur konstitutiven AID-Expression und damit Hypermutationsaktivität in Lymphomen leisten. Translokationen von *bcl6* treten in DLCLs häufig auf und hohe Bcl6-Expression korreliert mit dem klinischen Verlauf (Iqbal et al., 2007), allerdings konnte bisher kein klarer Zusammenhang zwischen Deregulation von Bcl6 durch Translokation oder Mutationen und der klinischen Prognose gezeigt werden (Chen et al., 2006). Fortdauernde Hypermutation in Lymphomen könnte trotzdem eine Folge der Bcl6-Expression sein, da diese wie hier gezeigt einen positiven Effekt auf AID, den wichtigsten Hypermutationsfaktor aufweist.

Auch für E2A ist mit der RNAi-Methode der erwartete Effekt zu beobachten. Dies könnte bedeuten, dass die Überexpression durch die Mutationen im Überexpressionsvektor nicht erfolgreich war und deshalb kein Effekt auftrat oder dass nur ein Senken der E2A-Level einen Einfluss auf AID hat, weil die positive Regulation in den untersuchten Zellen auch ohne zusätzliche Überexpression schon maximal ausgeschöpft wurde.

Für c-Myc werden die Implikationen der RNA-Interferenzdaten zusammen mit dem für diesen Faktor mittels konditionalen Zellsystemen und Inhibitoren gewonnenen größeren Datensatz im nächsten Abschnitt diskutiert.

4.3.3.2 Konditionale Zellsysteme und Inhibitoren

Aufgrund der großen Bedeutung, die c-Myc in Burkitt-Lymphomen hat, und verschiedener Vorergebnisse wurden für diesen Transkriptionsfaktor weitere Experimente mit anderen Zellsystem und experimentellen Ansätzen durchgeführt.

Die konditionale c-Myc-Modellzelllinie P493.6 wurde bereits in verschiedenen Arbeiten verwendet um Effekte von c-Myc auf Zellwachstum, Zellzyklus, ribosomale RNA-Prozessierung und das induzierte Transkriptionsprogramm zu untersuchen (Pajic et al., 2000; Schlosser et al., 2003; Schuhmacher et al., 2001; Schuhmacher et al., 1999). Sie wurde hier dazu verwendet um transkriptionelle und posttranskriptionelle Effekte auf AID und die anderen Transkriptionsfaktoren E2A, Pax5 und Bcl6 zu identifizieren, die dann in Burkitt-Lymphomen bestätigt werden konnten.

Ein erster Hinweis auf die mögliche Bedeutung von c-Myc für das Keimzentrums-Transkriptionsprogramm ist der positive Einfluss auf den Zentroblastenmarker CD77. Sowohl das Abschalten von c-Myc durch Zugabe von Tetrazyklin als auch die Verwendung eines Myc-Inhibitors führten zu einem Absinken des Anteils CD77-positiver Zellen. Eine Zugabe des Inhibitors zu hypermutierenden BL-Zelllinien bestätigte diesen Effekt. Da die CD77-Oberflächenexpression in verschiedenen Zelllinien mit ihrer Hypermutationsaktivität korrelierte, erscheint es möglich, dass die Faktoren, die die CD77-Expression regulieren, auch auf die Regulation der SHM Einfluss nehmen. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass auch die Proliferation einen Einfluss auf die CD77-Expression aufweist, da P493.6 Zellen in serum-freien Medium CD77-negativ erscheinen (Daten nicht gezeigt). Dies könnte jedoch auch auf die Aktivierung einer Stressantwort in den Zellen zurückzuführen sein, so dass der Zusammenhang mit Proliferation nicht eindeutig ist. Außerdem zeigen sich keine systematischen Unterschiede im Proliferationsverhalten von Zellen mit unterschiedlichem CD77-Status, weder im Vergleich verschiedener Zelllinien noch im Vergleich von Einzelzellklonen innerhalb einer Zelllinie.

In Kinetik-Experimenten zeigte sich auf RNA-Ebene ein transienter positiver Effekt von c-Myc auf bcl6 und eine Modulation der AID-Expression. Auf E2A war kein Effekt zu verzeichnen, obwohl dies in Untersuchungen in der Hühner-B-Zelllinie DT40 als c-Myc Zielgen beschrieben wurde (Neiman et al., 2001). Andererseits hatten frühere Untersuchungen in der P493.6 Zelllinie ebenfalls keine Regulation von E2A gezeigt (Schuhmacher et al., 2001).

Bei der Untersuchung der Proteinexpression sowie der RNA-Level nach längeren Zeiträumen zeigten sich erhöhte Proteinmengen von E2A und AID in Zellen, die auf einem c-Myc-Transkriptionsprogramm proliferieren, im Vergleich mit ruhenden oder EBV-gesteuerten

Zellen. Dieser Effekt war nur teilweise auf transkriptionelle Regulation zurückzuführen, weil die Unterschiede der Proteinlevel deutlich stärker ausgeprägt waren. Für Bcl6 war es aus technischen Gründen nur in einem Experiment möglich einen positiven Effekt von c-Myc auf Bcl6-Protein zu zeigen. Die transiente Induktion auf RNA-Ebene zeigte keinen Einfluss auf die Proteinmengen.

Insgesamt war also eine dauerhaft erhöhte Proteinmenge von AID, E2A und möglicherweise Bcl6 in P493.6 Zellen zu verzeichnen, die unter c-Myc proliferieren. Diese Einflüsse von c-Myc konnten durch Inhibitorexperimente auch in Burkitt-Lymphomzelllinien gezeigt werden. In den BL-Zelllinien waren die Effekte für Bcl6 und E2A sehr deutlich, auf Proteinebene stärker als auf RNA-Ebene. Die Effekte auf AID waren dagegen schwächer als in P493.6. Auch wenn diese Experimente keine Schlüsse über die genaue Art der Regulation zulassen, könnten sie einen Hinweis darauf liefern, warum Burkitt-Lymphome unter c-Myc-Einfluss einen Keimzentrumsphänotyp aufrechterhalten und fortdauernde Hypermutation zeigen.

In einem Pilotexperiment in der hypermutierenden Raji-BL-Zelllinie konnte ein Effekt eines Myc-Inhibitors auf die Hypermutation gezeigt werden. Da der Inhibitor auch einen deutlichen Einfluß auf die Proliferation zeigte, lässt sich nicht klar zwischen einem direkten Effekt von c-Myc auf die Hypermutation und einem generalisierten Einfluss durch erhöhte Proliferation unterscheiden. Obwohl der Mechanismus der somatischen Hypermutation, in dessen erster Phase Läsionen durch Replikation über die unreparierten Fehlpaarungen fixiert werden können, einen Zusammenhang mit Proliferation nahe legt, konnte dieser experimentell nicht gezeigt werden (Wang und Wabl, 2005). Dies kann auch insoweit interpretiert werden, dass c-Myc durch seinen Einfluss auf Proliferation und mögliche Effekte auf Keimzentrumstranskriptionsfaktoren die SHM-Aktivität fördert. Im Zusammenhang mit der Burkitt-Lymphomentstehung könnten die fortdauernde somatische Hypermutation und mögliche daraus entstehende aberrante Mutationen weitere mutagene Veränderungen herbeiführen. Insofern könnte c-Myc neben dem Erhalt der Lymphome durch den Einfluss auf Proliferation und Zellzyklus auch einen Beitrag zur Mutagenese leisten.

4.4 Ausblick

Die Regulation der somatischen Hypermutation ist eine zentrale Frage der B-Zellentwicklung, wie der hohe Anteil von Lymphomen mit einem Keimzentrumsursprung und Translokationen, die als Nebenprodukte von Immunglobulindiversifikation auftreten, verdeutlichen (Küppers, 2005). Die Ansätze zur Untersuchung dieser Frage sind vielfältig und Transkriptionsfaktoren nur ein möglicher Einflussfaktor. In dieser Arbeit konnte für E2A, Pax5 und Bcl6 kein Effekt auf SHM nachgewiesen werden. Es wurden jedoch Methoden etabliert und weiterentwickelt,

die ähnliche Untersuchungen für andere mögliche Einflussfaktoren ermöglichen. Hierfür kommen beispielsweise A-Myb und OBF1 in Frage, zwei Keimzentrumstranskriptionsfaktoren, über deren Einfluss auf die SHM weniger bekannt ist als über die hier untersuchten Faktoren. Auch Transkriptionsfaktoren, die als Interaktionspartner von AID identifiziert werden konnten, TFEB und TFE3, könnten mit diesem Ansatz analysiert werden (S. Tobollik, Doktorarbeit). Die Kombination von Überexpression und Hypermutationsassay in Einzelzellklonen bietet für solche Untersuchungen ein stabiles System. Die Anwendung der shRNA-Vektoren in der in dieser Arbeit gezeigten Form ist zwar nicht mit Analysen der Hypermutation kombinierbar, eine Nutzung von induzierbaren siRNA-Vektoren könnte dieses Problem jedoch lösen und eine unabhängige Kontrolle von Überexpressionseffekten liefern. Ursprünglich erschien dies wegen der teilweise niedrigen Effizienz der RNA-Interferenz nicht möglich, aber die Untersuchung der Effekte auf Proteinebene eröffnet diesbezüglich neue Möglichkeiten.

Der andere Aspekt dieser Arbeit, der weiter verfolgt werden sollte, ist der Einfluss von c-Myc auf die somatische Hypermutation besonders im speziellen Fall der BL-Lymphomgenese. Hierfür wäre zunächst die Verwendung eines unabhängigen zweiten Inhibitors wichtig. Um Aussagen über die Relevanz der Effekte *in vivo* machen zu können wären außerdem Experimente in einem geeigneten Mausmodell notwendig. Zurzeit ist jedoch kein Mausmodell bekannt, in dem hypermutierende Zellen in Lymphomen nachgewiesen wurden. Arbeiten ein solches Modell zu schaffen sind im Institut eingeleitet worden und sollen zur Generierung einer Maus führen, die Tet-abhängig in Keimzentrums-B-Zellen c-Myc (über)exprimiert (G. Bornkamm, persönliche Mitteilung). Das mögliche Auftreten und insbesondere die Charakteristika von Tumoren in diesen Mäusen könnten die Bedeutung von c-Myc für die Lymphomentstehung im Keimzentrum belegen. Es bestünde außerdem die Möglichkeit Keimzentrumszellen dieser Mäuse mit und ohne Induktion zu isolieren und in diesen *in vitro* den Einfluss der c-Myc-Überexpression auf die Keimzentrumstranskriptionsfaktoren und die somatische Hypermutation zu untersuchen und damit die Ergebnisse dieser Arbeit *in vivo* zu verifizieren.

5 Material

5.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Chemikalien und Verbrauchsmaterialien wurden von folgenden Firmen bezogen:

Applied Biosystems (Foster City, USA), BD Biosciences (Heidelberg), Biochrom (Berlin), BioRad (München), Costar (Bodenheim), Dianova (Hamburg), Eppendorf (Hamburg), Fluka (Taufkirchen-München), GE Healthcare Europe (ehemals Amersham Biosciences, Freiburg), Greiner (Frickenhäusen, Nürtlingen), Integra Biosciences (Fernwald), Invitrogen (Karlsruhe), Kodak (Rochester, USA), Labor Schubert & Weiß GmbH (München), Laborteam K+K (München), MBI-Fermentas (St.Leon-Rot), Merck (Darmstadt), Millipore (Bedford, USA), MP Biomedicals (Eschwege), Milteny Biotec GmbH (Bergisch Gladbach), NEB (Schwalbach), neolab (Heidelberg), Nunc (Wiesbaden), PAA (Pasching, Österreich), Perbio Science (Bonn), Promega (Mannheim), Qiagen (Hilden), Roche Applied Science (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Sigma-Aldrich (Taufkirchen-München), Stratagene (Amsterdam, Niederlande), c-Myc-Inhibitor (Calbiochem, Vertrieb durch Merck, Darmstadt)

5.2 Geräte

Elektrophoresekammer	BioRad, Hercules, USA
Elektroporator	BioRad, Hercules, USA
Entwicklermaschine	X-OMAT Kodak, USA
Eppendorf-Tischzentrifuge	Eppendorf, Köln
FACSCalibur	Becton Dickinson, USA
FACScan	Becton Dickinson, USA
Inkubator	Heraeus Christ Instruments, Düsseldorf
LightCycler	Roche, Mannheim
MACS-System	Milteny Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
Mikroskop	Zeiss, Jena
Neubauer-Zählkammer	Schubert & Weiss
PCR-Maschine	Biometra, Göttingen
Photometer	Eppendorf, Köln
Umluft-Sterilbank	Heraeus Christ Instruments, Düsseldorf
Zentrifuge	Heraeus Christ Instruments, Düsseldorf

5.3 Datenverarbeitung

Folgende Programme wurden benutzt:

Sci Ed Central (Clone Manager 6)	Sequenzverarbeitung
Microsoft Word 2003+2007	Textverarbeitung
Adobe Photoshop 7.0	Bildverarbeitung
Excel 2003+2007	zum Erstellen der Tabellen
Power Point 2003+2007	Grafiken
CellQuest	FACS Datenaquisition und -auswertung
Chromas	Sequenzauswertung

5.4 Bakterien

Es wurde für Klonierungen der *Escherichia coli*-Stamm DH5 α benutzt. Genotyp:

F⁻, ϕ dlacZ Δ M15, endA1, recA1, hsdR17 (r_k⁻, m_k⁻), supE44, thi-1, gyrA96, relA1, Δ (lacZYA-argF)U169, λ ⁻

5.5 Verwendete Kits

DC Protein Assay (BioRad, München); ECL Kit (GE Healthcare, Europa); super ECL Kit (GE Healthcare, Europa); FastStart DNA Master SYBR Green I Kit (Roche Applied Science, Mannheim); 1st Strand cDNA Synthesis Kit (Roche Applied Science, Mannheim); GFX Micro Plasmid Prep Kit (Amersham Biosciences, Freiburg); Jet Star 2.0 Plasmid Purification Kit (Genomed, Löhne); QIAgen Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden); QIAgen PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden); RNeasy Kit (Qiagen, Hilden); TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen, Karlsruhe); jETTM PCR Cloning Kits (Fermentas)

5.6 Enzyme

Restriktionsenzyme sowie dazugehörigen Reaktionspuffer (10x) wurden von MBI-Fermentas (St.Leon-Rot), NEB (Schwalbach) und Roche Applied Science (Mannheim) bezogen.

T4-DNA-Ligase sowie dazugehöriger Puffer kamen von Roche Applied Science (Mannheim). *Taq*-Polymerase und Puffer wurde von Roche Applied Science (Mannheim) und Qiagen (Hilden) bezogen. High Fidelity Polymerase und Alkalische Phosphatase (CIP) stammten von Roche Applied Science (Mannheim).

5.7 Größenstandard

Proteingrößenstandard

Zur Bestimmung des molekularen Gewichts von Proteinen, die in einem SDS-PAGE aufgetrennt worden waren, wurde neben den Proben ein Marker geladen. Dieser Proteinstandard enthält 10 Proteine mit einer Größe zwischen ca. 10 und 190kD. Um die Proteine im Standard sichtbar zu machen ist ein blauer oder roter Farbstoff kovalent an diese gebunden. Der verwendete Standard ist der Proteingrößenstandard Page RulerTM Prestained Protein Ladder der Firma Fermentas (St.Leon-Rot) (siehe Abbildung 37).

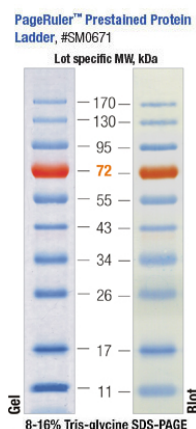


Abbildung 37 Proteingrößenstandard

Page RulerTM Prestained Protein Ladder der Firma Fermentas

DNA-Größenstandard

Um die Größe von DNA-Fragmenten auf Agaraosegelen abschätzen zu können wurde ein DNA-Größenmarker Gene RulerTM DNA Ladder Mix von MBI Fermentas (St.Leon-Rot) verwendet.

5.8 Antikörper

Tabelle 5: In der Western Blot-Analytik verwendete Antikörper

Spezifität	Verdünnung	aus	Bezugsquelle
AID (5G9)	1:5	Ratte	E.Kremmer, Helmholtz Zentrum, München
E2A	1:1000	Kaninchen	Santa Cruz (sc-348)
Pax5	1:200	Maus	Santa Cruz(sc-13146)
Actin	1:1000	Maus	Santa Cruz(sc-8432)
Bcl6	1:200	Kaninchen	Cell Signalling (4242)
C-Myc	1:200-1:1000	Kaninchen	Santa Cruz (N262)
GAPDH	1:3000	Kaninchen	Abcam (ab9385)
Tubulin	1:1000	Kaninchen	Abcam(ab4047)
GAPDH	1:2000	Maus	Abcam (ab9484)
α -Maus IgG (HRP gekoppelt)	1:5000	Ziege	Promega (W4021)
α -Kaninchen IgM und IgG (HRP gekoppelt)	1:10.000	Ziege	Jackson Immuno Research 112-035-044
α -Ratte IgG (HRP gekoppelt)	1:3.000	Ziege	Cell Signalling (7074)

Tabelle 6: In der FACS-Analytik und MACS-Separation verwendete Antikörper

Spezifität	Verdünnung	aus	Bezugsquelle
Ngfr (PE-gekoppelt)	1:50	Maus	BD Biosciences (557196)
Ngfr-Zellüberstand	1:1	Maus	E.Kremmer, Helmholtz Zentrum München
Maus (<i>microbeads</i>)	1:1		Miltenyi Biotec
CD77	1:5	Maus	BD Pharmigen (551353)
CD38	1:20	Maus	BD Biosciences (555460)

5.9 Oligonukleotide

Alle für Klonierungen verwendeten Oligos wurden bei Metabion (Martinsried, München) bestellt. Lightcyclerprimer wurden bis 2007 ebenfalls dort bestellt, danach bei Sigma Genosys (Taufkirchen, München).

Tabelle 7: Primer zur Amplifikation der cDNA für die Klonierung von Überexpressionvektoren

Primer-Name	Nukleotidsequenz (5' → 3')
E2Afor	<u>GGCCTCACTGGCC</u> ACCATGAACCAGCCGCAGAGGATG
E2Arev	<u>GGCCTCACTGGCC</u> GTCGACTCACATGTGCCCCGGCGGGG
Bcl6F	<u>GGCCTCACTGGCC</u> ACCATGGCCTCGCCGGCTGACA
Bcl6R	<u>GGCCTCACTGGCC</u> GAGCTCGATTCTGAGAAGGGGCTGGAG
Pax5F	<u>GGCCTCACTGGCC</u> ACCATGGATTAGAGAAAAATTATCCG
Pax5R	<u>GGCCTCACTGGCC</u> GAGCTCTCACCTCAATAGGTGCCATC

Durch die verwendeten Primer wurden am 5' Ende der PCR-Produkte eine sfi-Restriktionsstelle (unterstrichen) eingeführt, die für die Klonierung in den Expressionsvektor genutzt wurde.

Tabelle 8: DNA-Oligonukleotide für (quantitative) RT-PCR-Reaktionen

Primer-Name	Nukleotidsequenz (5' → 3')	Bedingungen
hAIDRT2	GTGACATTCCTGGAAGTTGC	Annealing: 63°, Elongation: 19 s
hAIDRT3	CCAACCTCAGTCTGAGGATCTTC	
hHPRT3	CTAATGTGATAGACTACTGCTTTG	Annealing: 63°, Elongation: 14 s
hHPRT2	CCAAACTCAACTTGAACCTCTC	
hCMV3	GCATTATGCCAGTACATGACC	Annealing: 63°, Elongation: 14 s
hCMV4	CGGTTCACTAAACGAGCTCTGC	
CD19for	CTCCTTCTCCAACGCTGAGT	Annealing: 65°, Elongation: 19 s
CD19rev	TGGAAGTGTCACTGGCATGT	
hcmvRT1	CAGCAGCCTCCCGCGACGATG	Annealing: 65°, Elongation: 24 s
hcmvRT4	GGACATTTCTGTTAGAAGGAATCG	
hmuHCRT1	CTGACCTTCCAGCAGAATGCG	Annealing: 65°, Elongation: 19 s
hmuHCRT2	AAGTAGACATCGGGCCTGTGC	
bcl6 RT3	CCCAGTCTGAGTACTCAGATTC	Annealing: 65°, Elongation: 24 s
Bcl6RT4	GTGACGGAAATGCAGGTTACAC	
CDK4for	CTTCATGCCAATTGCATCGTTACCGAG	Annealing: 68°C Elongation: 14 s
CDK4rev	CATCTCGAGGCCAGTCATCCTCTGG	
E12 F1	CAGACGAGGACGAGGACGAC	Annealing: 65°, Elongation: 19 s
E12 R2	ACCACACCTGACACCTTTTCT	
E47 for	GTCCTGGAGGAGAAAGAC	Annealing: 63°C, Elongation: 26 s
E47 rev	CGGAGGCATACCTTTTACAT	
PaxRTfor	GTGTGTGACAATGACACCGTG	Annealing: 65°, Elongation: 19 s
PaxRTrev	GTCTCATAAGTCGGTACCGGA	
Rib208	CTCCTAAAGCTGAAGCCAAA	Annealing: 63°, Elongation: 19 s
Rib209	GCCTGTTTAATCTGGTGCTT	

Tabelle 9: Oligonukleotide für die Klonierung von shRNA-Vektoren

Primer-Name	Nukleotidsequenz (5' → 3')
Bcl6.366 F	CGCCATGCCAGTGATGTTCTTCTTCAAGAGAAGAAGAACATCACTGGCATGGTTTTTC
Bcl6.366 R	TCGAGAAAAACCATGCCAGTGATGTTCTTCTTCTCTTGAAAGAAGAACATCACTGGCATGGCG
Bcl6.439 F	CGTGAGCCGTGAGCAGTTTAGATCAAGAGATCTAAAGTCTACGGCTCACTTTTTTC
Bcl6.439 R	TCGAGAAAAAGTGAGCCGTGAGCAGTTTAGATCTCTTGAACTAAAGTCTACGGCTCAC
Bcl6.527 F	CGCAACCTTAGTGAGATCAATCTCAAGAGAGATTGATCACACTAAGGTTGCTTTTTTC
Bcl6.527 R	TCGAGAAAAAGCAACCTTAGTGATCAATCTCTCTTGAAAGATTGATCACACTAAGGTTGC
Cmyc.1 F	CGCTATGACCTCGACTACGACTCTCAAGAGAGAGTCGTAGTCGAGGTCATAGTTTTTC
Cmyc.1 R	TCGAGAAAAACTATGACCTCGACTACGACTCTCTCTTGAAAGAGTCGTAGTCGAGGTCATAGCG
Cmyc.2 F	CCGATGAGGAAGAAATCGATGTTTCAAGAGAAACATCGATTCTCTCATCTTTTTTC
Cmyc.2 R	TCGAGAAAAAGATGAGGAAGAAATCGATGTTTCTCTTGAAACATCGATTCTCTCATCTCG
Cmyc.3 F	CCGAAACGACGAGAACAGTTGAATCAAGAGATTCAACTGTTCTCGTCGTTCTTTTTTC
Cmyc.3 R	TCGAGAAAAAGAAACGACGAGAACAGTTGAATCTCTTGAAATCAACTGTTCTCGTCGTTTTCG

Unterstrichen ist die XhoI Restriktionsschnittstelle zur Klonierung in den Expressionsvektor, fettgedruckt ist die siRNA Sequenz dargestellt und in rot ist die für alle Oligopaare gleiche Loopsequenz eingezeichnet.

Die c-myc-spezifischen shRNA-Vektoren wurden von B. Jungnickel zur Verfügung gestellt. Pax5 und E2A-spezifische Vektoren wurden von T. Thiel generiert (T. Thiel, Diplomarbeit)

5.10 Plasmide

In der Tabelle aufgeführt sind alle verwendeten Plasmide, die nicht im Rahmen dieser Arbeit generiert wurden, die Bezugsquelle und wichtige Eigenschaften der jeweiligen Vektoren.

Tabelle 10: Verwendete Plasmide

Name	Bezugsquelle	Bemerkungen
Ausgangsvektoren für Klonierung		
pBC230	G. Bornkamm	CMV-Promotor für GOI; Enhancer: MAR, E3', E _i . SV40-Promotor vor Hygromycinresistenzgen; OriP; EBNA1-Gen; Ampizillinresistenzgen.
pBBTAG	Jürgen Bachl	Hypermutationsreporter mit TK Promotor vor Hygromycinresistenzgen
pMM8-Rad51	M. Mierau	Puromycinresistenz
pEBNA-SVH-NL-E μ CAG-rTA-TR	G. Bornkamm	pRTS-Derivat
GFP-Positivkontrolle		
pAK6	M. Mierau, München	Hygromycinresistenz
Insertion für Überexpressionsvektoren		
c-myc	M. Schlee, München	
HA-AID	M. Mierau, München	
Klonierungszwischenvektoren		
pTOPO	Invitrogen	TOPO-TA Cloning Kit
pBJ3-PincU6-ngfr*	B. Jungnickel	Zwischenvektor für RNAi-Vektoren
pJET1	Fermentas	Jet1 TM PCR Cloning Kit
RNAi-Vektoren		
E2A.2	T. Thiel, München	
E2A.3	T. Thiel, München	
Pax5.1	T. Thiel, München	
Pax5.2	T. Thiel, München	
pBJ3	B. Jungnickel	Leervektor als Negativkontrolle
pBJ11	B. Jungnickel	Gegen AID gerichtete RNAi
pBJ13	B. Jungnickel	Gegen GFP gerichtete RNAi
Cmyc1	B. Jungnickel	
Cmyc2	B. Jungnickel	
Cmyc3	B. Jungnickel	

5.11 Zelllinien

Tabelle 11: Verwendete Zelllinien

Zelllinie	Bezugsquelle	Bemerkungen
Burkitt-Lymphom-Zelllinien EBV-negativ		
BL100	B. Jungnickel, München	
Mutu(-)	J. Mergler, München	EBV- Verlust
BL70	B. Jungnickel, München	
DG75	B. Kempkes, München	
Burkitt Lymphom-Zelllinie EBV-positiv		
Raji ATCC	J. Bachl, München	
BL60	B. Jungnickel	
P3HR1	K. Braunschmidt, München	EBNA2 nicht funktional
HH514	K. Braunschmidt, München	EBNA2 und <i>p53</i> nicht funktional
MutuIII	J. Mergler, München	EBV Latenz III
Burkitt-Lymphom-ähnliche Zelllinien		
BJAB	B. Kempkes, München	EBV neg.
Lymphoblastoide Zelllinie		
721	B. Kempkes, München	
Konditional immortalisierte Zelllinien		
EREB2-5	M. Schlee + B. Kempkes, München	mit Östrogen regulierbares EBNA2 und EBNA2 defizienter EBV Stamm (P3HR1)
P493.6	B. Kempkes, München	mit Östrogen regulierbares EBNA2 und Tet-regulierbares c-Myc
Humane prä-B-Zelllinie		
Nalm6	J. Bachl, München	

6 Methoden

6.1 Zellbiologische Techniken

6.1.1 Auftauen und Einfrieren von Zellen

Die Zellen wurden in 1 bis 1,5 ml FKS mit 10% DMSO bei minus 80°C oder im flüssigen Stickstoff eingefroren.

Zum Autauen wurden die Zellen in 20ml Zellkulturmedium aufgenommen, gewaschen und mit 10ml frischem Zellkulturmedium in eine Zellkulturflasche transferiert. Zusätzlich wurde dem Medium einmalig 1:100 HEPES (1 M) und 1:1000 α -Thioglycerol (50 mM) zugefügt.

6.1.2 Zellkultur

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen in einer Umluft-Sterilbank (Heareus Christ Instruments, Düsseldorf) mit sterilen Glas- oder Plastikpipetten vorgenommen. Die Zellen wurden in einem Inkubator (Heareus Christ Instruments, Düsseldorf) bei 5 % CO₂, 95 % Luftfeuchtigkeit und 37°C kultiviert.

Kulturmedium

500 ml	RPMI 1640 Medium (Invitrogen, Karlsruhe)	
50 ml	FKS (PAA, Pasching, Österreich)	10 %
5 ml	Penicillin/Streptomycin (Invitrogen, Karlsruhe)	100 U/ml 100 µg/ml
5 ml	Glutamin (200 mM) (Invitrogen, Karlsruhe)	2 mM
5 ml	Natriumpyruvat (100 mM) (Invitrogen, Karlsruhe)	1 mM

Bei der konditional immortalisierten Zelllinie EREB2-5 wurde zusätzlich 2 µM Östrogen zum Kulturmedium gegeben. Überexpressionsklone der Zelllinie Raji wurden in Gegenwart von 0,8 µg/ml Puromycin kultiviert. Für andere transfizierte Zellen und Hypermutationsassays wurde eine optimierte Menge Hygromycin oder Puromycin dem Medium zugefügt. Nach einer Serumumstellung Anfang 2008 änderte sich jedoch das Wachstum der Zellen und die Selektionseffizienz. In den meisten Zellen waren danach größere Mengen Antibiotikum für eine effiziente Selektion notwendig.

Für die Induktion von Überexpressionsvektoren wurde 1:1000 Doxycyclin (1 mg/ml) eingesetzt.

Die Bestimmung der Zelldichte wurde mit einer Neubauer Zählkammer durchgeführt.

6.1.3 Schaltung der P493.6 Zelllinie

Für die Untersuchung transkriptioneller Effekte von c-Myc wurde den P493.6-Zellen 100 ng/ml Tetrazyklin ins Medium zugefügt. Nach drei Tagen war auf Proteinebene fast kein c-Myc mehr nachweisbar, das Tetrazyklin wurde ausgewaschen und die Zellen in normales Kulturmedium überführt. Zu den gewünschten Zeitpunkten wurden Proben entnommen.

Zur Untersuchung von Proteineffekten wurden eine einheitliche Kultur geteilt und je nach Bedingung für fünf Tage in Normalmedium oder einem Medium mit 2 μ M Östrogen und/oder 100 ng/ml Tetrazyklin kultiviert.

Um Effekte des Myc-Inhibitors zu untersuchen wurde den Zellen 64 μ M des Inhibitors (Calbiochem Katalognr.:475956, vertrieben durch Merck, Darmstadt) gelöst in DMSO zugefügt und in den Kontrollen eine entsprechende Menge DMSO hinzugegeben.

6.1.4 Generieren von Einzelzellklonen

Zur Generierung von Einzelzellklonen wurden Zellen der entsprechenden Zelllinie gezählt, auf eine Dichte von 30, 3 und 0,3 Zellen pro ml verdünnt und je 10 ml in einer 96-Lochplatte ausplattiert. Nach drei bis vier Wochen wurden aus den Platten der höchsten Verdünnungsstufe, die ein Wachstum von Kolonien zeigten, Einzelzellklone isoliert. Mit dieser Methode ist ein oligoklonaler Ursprung der Klone nicht gänzlich ausgeschlossen, aber unwahrscheinlich.

Für die Generierung von Überexpressionsklonen wurden Raji-Zellen mit den Überexpressionsvektoren transfiziert, mit Medium verdünnt und auf 96-Wellplatten ausplattiert. Nach einem Tag wurde 0,8 μ g/ml Puromycin zur Selektion zugefügt. Nach etwa drei Wochen wachsen in etwa 2-10% der Löchern Kolonien aus, die weiter vermehrt werden, bis die Zellzahl zum Testen und Charakterisieren ausreicht.

6.1.5 Transfektion

Die Dichte der Zellen wurde ermittelt und je nach Zahl der verfügbaren Zellen und den für das Experiment nötigen Zellen wurden zwischen 1×10^7 und 2×10^7 pro Transfektion verwendet. Die Zellen wurden in 20 ml PBS bzw. serumfreiem RPMI-Medium gewaschen, in 400 μ l PBS bzw 250 μ l RPMI aufgenommen und in Küvetten mit 0,4 cm Elektrodenabstand transferiert. In die Küvetten wurde 10 μ g DNA pro 1×10^7 Zellen zugegeben und das Gemisch für 15 min auf Eis inkubiert, bevor die Transfektion im Elektroporator (BioRad) durchgeführt wurde. Die Zellen wurden in 10 ml Kulturmedium überführt und 1:100 HEPES (1M) hinzugefügt.

Die verwendeten Transfektionsparameter sind in Tabelle 12 zusammengefasst.

Tabelle 12: Transfektionsparameter

Zelllinie	Puffer	Volt	Kapazität
Raji, BL100, BL60, DG75, EREB2-5, P493.6, Mutu(-), MutuIII, HH514, P3HR1, BL70, Nalm6	400 µl PBS	250	850
BJAB	250 µl RPMI	250	850
721	250 µl RPMI	180	975

6.1.6 FACS (Fluorescence activated cell sorting)

Für die Analyse im Durchflusszytometer wurden die Zellen erst in PBS gewaschen und dann in PBS/0,5 % BSA resuspendiert. Um tote Zellen anzufärben, wurden den Zellen 1 µg/ml Propidiumiodid zugesetzt.

Für die Analyse der CD38/CD77-Färbung wurden 5×10^4 Zellen gewaschen und in 10 µl PBS/0,5% BSA aufgenommen. Die Zellen wurden zu den vorgelegten Antikörpern (2 µl CD77-FITC; 0,5 µl CD38-PE) pipettiert und für 1 Stunde auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen, in PBS mit Propidiumiodid aufgenommen und im FACS analysiert. Die Messungen wurden auf einem FACSscan- oder FACSCalibur-Gerät (BD Biosciences, Heidelberg) vorgenommen. Die Analyse der aufgezeichneten Daten erfolgte mit der Cell Quest-Software von BD Sciences (Heidelberg).

6.1.7 Bestimmung der Hypermutationsaktivität

2×10^7 Zellen wurden mit dem Hypermutationsvektor (pSHM-SV) oder einer GFP-Kontrolle (pAK6) transfiziert und in Zellkulturmedium überführt. Bei Hypermutationsassays von Überexpressionseinzellklonen enthält das Medium zusätzlich Puromycin. Am dritten Tag nach der Transfektion wird den Zellen je nach Zelllinie eine abgestimmte Menge Hygromycin als Selektionsmedium zugefügt. Nach 10 bis 12 Tagen war die Selektion in der Regel abgeschlossen, was am Anteil GFP-positiver Zellen in der GFP-Kontrolle zu erkennen war.

Beginnend am Tag nach der Transfektion wurde für etwa einen Monat alle zwei bis drei Tag eine FACS-Analyse durchgeführt. Dazu wurde ein Teil der Zellen abgenommen und mit Propidiumiodid eine Unterscheidung der toten von den lebenden Zellen ermöglicht. Bei jeder FACS-Messung wurde nach Möglichkeit eine Million lebende Zellen untersucht und der Anteil GFP-positiver Zellen ermittelt. Die Zahl GFP-positiver Zellen pro 100.000 lebende Zellen, über den gesamten Verlauf des Assays aufgetragen, ergibt eine Darstellung der Hypermutationsaktivität.

Bei der Kombination von Überexpressionsuntersuchungen mit Hypermutationsassays, wurde nach Abschluss der Selektion etwa an Tag 12 die Kultur geteilt und mit verschiedenen Mengen Doxyzyklin die Überexpression induziert. Der Erfolg der Überexpression wurde durch wöchentliche ngfr-Färbungen der Kulturen überprüft und zusätzliche Proteinanalysen wurden durchgeführt.

6.1.8 MACS-Aufreinigung

Die Aufreinigung mit der MACS-Methode der Milteny Biotec GmbH (Bergisch Gladbach) beruht auf der Bindung von Zellen über Antikörper an magnetische Beads, die zunächst durch Anwendung der Säulen in einem starken Magnetfeld in den Säulen zurückgehalten werden und in einem anschließenden Elutionsschritt außerhalb des Magnetfeldes aufgefangen werden können (siehe Abbildung 38). Das MACS-System wird vom Hersteller mit zwei verschiedenen Säulenvarianten angeboten, solchen zur Depletion, die auf eine möglichst reine negative Fraktion optimiert sind, und Säulen zur Separation, die einen großen Anteil positiver Zellen nicht nur binden, sondern bei der Elution auch wieder auswaschen (was bei den Depletionssäulen weniger effizient ist). Um möglichst reine positive und negative Fraktionen zu erhalten wurden deshalb beide Säulenvarianten in einem zweistufigen Verfahren verwendet wie in Abbildung 38B an einem Beispiel gezeigt.

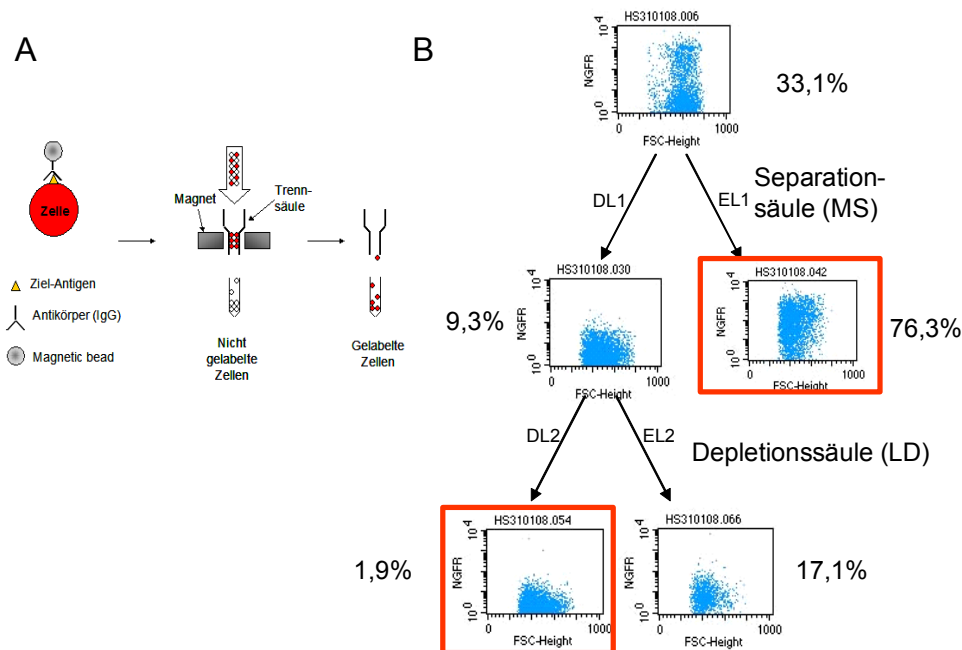


Abbildung 38: Prinzip der MACS-Aufreinigung

A) Das Prinzip der Bindung von magnetischen Beads über Antikörper an Zellen mit bestimmten Oberflächenmarkern und die Trennung der Zellen durch Aufreinigung im Magnetfeld (nach Milteny Biotec) **B)** Beispiel der Anwendung der zweistufigen MACS-Aufreinigung. Details im Text und siehe auch 3.4.3.

Es wurden zwei verschiedene Varianten von MACS-Aufreinigungen durchgeführt. Für eine zweistufige Aufreinigung wurden im ersten Aufreinigungsschritt kleinervolumige Separationssäulen (MS- statt der größeren LS-Säulen) verwendet. Daraus ergaben sich höhere Wasch- und Elutionsvolumina für die einstufige Auftrennung, die im Protokoll jeweils in Klammern angegeben sind:

- Die Zellen (maximal 1×10^8) wurden mit 3 ml PBS mit 5% FKS gewaschen und der Überstand vollständig entfernt.
- 100 μ l [150 μ l] ngfr-Zellüberstand wurden zugegeben und 15 min auf Eis inkubiert.
- Die Zellen wurden mit 3 ml PBS / 5% FKS gewaschen und der Überstand vollständig entfernt.
- 20 μ l [30 μ l] gegen Maus gerichtete magnetische Beads wurden zugegeben und für 30 min im Kühlschrank inkubiert
- Die Zellen wurden mit 3 ml PBS / 5% FKS gewaschen und in 500 μ l PBS/5% FKS aufgenommen.
- Die MS- [LS-] Säulen wurden im Magneten mit 3 ml PBS / 5% FKS equilibriert.
- Die Zellen wurden auf die Säulen gegeben und der Durchlauf (DL1) mit den ngfr-negativen Zellen schrittweise mit 3 ml PBS / 5% FKS ausgewaschen.
- Die Säulen wurden aus dem Magnetfeld entfernt und die ngfr-positiven Zellen mit 3 ml PBS / 5% FKS eluiert (EL1).

Bei einer einstufigen Aufreinigung erfolgte an dieser Stelle eine Pelletierung von DL1 und EL1. Für eine bessere Auftrennung wurden im zweistufigen Verfahren weitere positive Zellen aus dem Durchlauf entfernt. Das Eluat enthielt deutlich weniger Zellen, so dass eine weitere Aufreinigung nicht durchgeführt werden konnte.

- Der Durchlauf (DL1) wurde gewaschen und in 500 μ l PBS / 5% FKS aufgenommen.
- Eine LD-Säule wurde im Magneten mit 5 ml PBS / 5% FKS equilibriert.
- Die Zellen wurden auf die Säulen gegeben und der Durchlauf (DL2) mit den ngfr-negativen Zellen schrittweise mit 4,5 ml PBS / 5% FKS ausgewaschen.
- Die Säulen wurden aus dem Magnetfeld entfernt und die schwach ngfr-positiven Zellen mit 4 ml PBS / 5% FKS eluiert (EL2).

Der Durchlauf 2 und die Eluate wurden für Protein- und RNA-Analysen getrennt pelletiert. Zusätzlich wurde der Erfolg der Aufreinigung durch Proben, die am Anfang der Aufreinigung, nach der Bindung an die magnetischen Beads und aus allen Fraktionen der Aufreinigung entnommen wurden, mittels ngfr-Färbung und FACS-Analyse überprüft.

6.2 Techniken der DNA-Analyse

6.2.1 DNA-Isolierung und -Quantifizierung

Für die Isolation von DNA aus Bakterienkulturen wurde je nach benötigter DNA-Menge entweder eine Isolation nach Sambrock 1989 (Sambrook et al., 1989) durchgeführt, oder für größere Mengen das JetStar-Kit (von Genomed, Löhne) gemäß Herstellerangaben verwendet. Eine Quantifizierung wurde photometrisch vorgenommen (Photometer von Eppendorf, Köln).

6.2.2 Klonierung: Allgemeine Vorgehensweise

Alle **PCR-Reaktionen** für Klonierungen wurden mit einer Expand High Fidelity Polymerase (Roche, Mannheim) nach Angaben des Herstellers in einem TRIO-Thermoblock (Biometra, Göttingen) durchgeführt. Als Standardprogramm wurde über 35 Zyklen amplifiziert, wobei jeder Zyklus 45 s bei 95 °C, 30 s bei einer Primer-abhängigen Annealingtemperatur und 5 min bei 72 °C umfasste. Je nach dem weiteren Vorgehen schloss sich an die PCR-Reaktion ein fakultatives Anhängen von 3'Adenosin für die TOPO-TA-Klonierung oder eine *Blunting*-Reaktion für die Jet1™ PCR Kloning Kit-Klonierung, beides entsprechend Herstellerprotokoll durchgeführt an. Anschließend wurden die Produkte auf einem Agarosegel überprüft. Die PCR-Produkte wurden aus dem Gel aufgereinigt mittels Gel Extraktion Kit von Qiagen und bei niedriger DNA-Konzentration zusätzlich gefällt (mit 1/10 Vol Natriumacetat und 2,5 Vol 100% Ethanol).

Die aufgereinigten PCR-Produkte wurden in die entsprechenden Zwischenvektoren ligiert und hitzeschock-kompetente Zellen mit dem Ligationsansatz transformiert. Nach der Subklonierung wurden korrekte Klone mittels Restriktionsfragmentlängenanalyse ermittelt. Bei Auftreten des erwarteten Restriktionsfragmentlängenmusters wurden die entsprechenden Klone durch Sequenzieren (bei Sequiserve, Vaterstetten) überprüft und gegebenenfalls mehrere Klone kombiniert um eine korrekte Sequenz zu erhalten.

Die Umklonierung erfolgte durch Restriktion des Ausgangsvektors und der Insertion mit dem Enzym *Sfi*I. Beide Spaltungsprodukte wurden auf präparative Agarosegele aufgetragen und die entsprechenden ausgeschnitten und mittels Gel Purification Kit von Qiagen aufgereinigt. Um eine Religierung des linearisierten Vektors ohne Insert zu verhindern wurden die freien Enden durch Alkalische Phosphatase (CIP; Roche, Mannheim) dephosphoryliert und der Vektor mittels PCR Purification Kit von Qiagen aufgereinigt. Die Insertion und der linearisierte Vektor wurden in eine Ligation eingesetzt und diese in hitzeschockkompetenten Zellen transformiert. Subklone wurden durch Restriktionsfragmentlängenanalyse überprüft. Alle Einzelreaktionen wie Ligation oder Verdau wurden nach Herstellerangaben durchgeführt.

6.2.3 Klonierung der Überexpressionsvektoren

pEBNA-puro-20

Zunächst wurde als Expressionsvektor für alle Transkriptionsfaktoren ein vorhandener Vektor mit einem Tetrazyklin bzw. Doxyzyklin regulierbaren bidirektionalen Promotor umkloniert um statt einer Hygromycinresistenz eine Puromycinresistenz für die Selektion in B-Zellen zur Verfügung zu haben, da der verwendete Hypermutionsreporter bereits eine Hygromycinresistenz aufweist.

Als Ausgangsvektor diente der Vektor pEBNA-SVH-NL-E μ CAG-rTA-TR (von C. Kuklik-Roos). Als Insert wurde die Puromycinresistenz aus dem Vektor pMM8 Rad51 von M. Mierau verwendet. Beide Vektoren wurden mit den Restriktionsenzymen *NotI* und *Bst1107I* gespalten und die entsprechenden Fragmente aus dem Gel isoliert, ligiert und in DH5alpha transformiert. Die korrekte Ligation wurde mittels *EcoRI*-Restriktion überprüft.

pEBNA-E2A

Mit den dafür erstellten Primern wurde aus cDNA der Raji-Zelllinie das komplette E2A Transkript amplifiziert. Der PCR-Ansatz wurde mittels TOPO TA-Klonierung (Invitrogen) in den pCR2.1[®]-TOPO[®]-Vektor ligiert und nach einer Transformation Plasmid-DNA isoliert. Bei der Überprüfung wurden nur Sequenzen für die Transkriptionsvariante E12 und keine für E47 identifiziert, was angesichts der mRNA Mengen der beiden Faktoren auch zu erwarten war. Da es keine Sequenzen ohne Mutationen gab, wurde ein Plasmid mit einer Mutation durch ein mutationsfreies Insert aus einem anderen Plasmid mittels *BsiWI* und *BmgBI* Doppelspaltung korrigiert. Der Vektor wurde zusätzlich dephosphoryliert um Ligationen mit unverändertem oder ohne Insert zu unterbinden. Der Erfolg wurde durch eine Sequenzierung des Mittelteils des E2A Gens überprüft, welches keine Mutation mehr aufwies. Zusätzlich wurde eine Prüfung des Gesamtkonstrukts mittels *SfiI*-Spaltung vorgenommen.

Das E2A-Transkript wurde mittels *SfiI*-Spaltung in den Überexpressionsvektor pEBNA-puro kloniert und mittels *SalI*-Restriktion überprüft.

Erst nach der Durchführung aller in dieser Arbeit dargestellten Experimente wurde das Ende des Überexpressionsvektors sequenziert und dabei zahlreiche Mutationen (mehr als ein Dutzend) gefunden, die sehr wahrscheinlich zu einem nicht funktionellen Protein führen, weil sie in der bHLH-Domäne liegen, die für die Dimerisierung und damit die Aktivität entscheidend ist. Es handelt sich hauptsächlich um Punktmutationen, aber auch Deletionen und Insertionen sind zu beobachten. Erstaunlich ist, dass trotzdem ein Protein der erwarteten Länge nachweisbar war.

pEBNA-Pax

Mit den dafür erstellten Primern wurde aus cDNA der Raji-Zelllinie das komplette pax5-Transkript amplifiziert. Der PCR-Ansatz wurde einer Blunting-Reaktion unterzogen um für die Ligation in den Vektor geeignete Schnittstellen zu kreieren und anschließend gemäß der Anweisungen des Gene jET™ PCR Cloning Kits (Fermentas) in den pJET1/blunt-Klonierungsvektor ligiert. Nach der Transformation wurde Plasmid-DNA isoliert und mittels *SfiI*, *BamHI* und *PvuII* unabhängig überprüft. Anschließend wurden mehrere durch Sequenzierung auf Mutationen untersucht. Da alle DNA-Extrakte Mutationen aufwiesen wurden zwei durch einen *AarI*-Spaltung kombiniert um ein korrekten Vektor zu erhalten. Nach Bestätigung der korrekten Sequenz des entstandenen Vektors per Sequenzierung wurde das pax5 Transkript mittels *SfiI*-Spaltung aus dem Zwischenvektor entfernt und die dabei entstandenen zwei Fragmente in den *SfiI*-gespaltenen pEBNA-puro Überexpressionsvektor ligiert. Nach der Transformation wurden die Plasmide mittels *Eco47II*-Restriktion auf Richtigkeit überprüft.

pEBNA-bcl6

Mit den dafür erstellten Primern wurde aus cDNA der Raji-Zelllinie das komplette bcl6-Transkript amplifiziert. Der PCR-Ansatz wurde einer Blunting-Reaktion unterzogen um für die Ligation in den Vektor geeignete Schnittstellen zu kreieren und anschließend gemäß der Anweisungen des Gene jET™ PCR Cloning Kits (Fermentas) in den pJET1/blunt-Klonierungsvektor ligiert. Nach der Transformation wurden Plasmid-DNA isoliert und mittels *EcoRI* und *PvuII* unabhängig überprüft. Anschließend wurden mehrere Plasmide durch Sequenzierung auf Mutationen untersucht. Alle DNA-Extrakte wiesen dieselbe Mutation innerhalb der vorderen Primersequenz auf. Zur Korrektur wurde das von *SfiI*-Schnittstellen flankierte bcl6-Transkript mit *SfiI* verdaut und der vordere Teil durch eine Restriktion mit *BfuI*(=*BciV*) entfernt, mit aneinandergelagerten Oligonukleotiden mit der korrekten Sequenz ligiert und direkt in den Überexpressionsvektor ligiert. Nach Überprüfung durch eine *SfiI*- und *EcoRI*-Spaltung wurde die korrekte Sequenz zusätzlich durch Sequenzierung des entsprechenden Abschnitts bestätigt.

pEBNA-cmyc

Für die Klonierung des C-Myc Überexpressionsvektors lag bereits ein *SfiI*-flankiertes Insert vor und konnte durch eine *SfiI*-Spaltung direkt in den ebenfalls *SfiI*-gespaltenen pEBNA-puro20 Vektor ligiert werden. Nach der Transformation wurde die korrekte Orientierung des Insert mittels *PvuII*-Restriktion überprüft.

6.2.4 Klonierung der Hypermutionsreporter

pSHM-SV

In den vorhandenen pBBTAG (B. Busse, Diplomarbeit) sollte ein stärkerer Promotor vor die Hygromycinresistenz kloniert werden. Dazu wird eine Spaltung mit *CpoI* (schneidet innerhalb des Hyg-Gens) und *SgrAI* (schneidet im vor dem Hyg-Gen liegenden EBNA1-Gen) durchgeführt und das Insert mit dem SV-Promotor aus dem pBC230-Vektor anstelle des TK-Promotors eingesetzt. Der erfolgreiche Austausch wurde mittels *EcoRI*-Spaltung überprüft.

pSHM-SV-E

Aus dem neu klonierten pSHM-SV-Vektor sollten die Enhancer entfernt werden. Dazu wurde eine *HindIII*-Spaltung durchgeführt. Ein Insert wird dabei entfernt, ein zweites wieder in den Vektor ligiert. Anschließend wurde die korrekte Ligation mit *EcoRI*, *MmeI* und *NdeI* (für Richtungsprüfung am Besten geeignet) überprüft.

6.2.5 Klonierung der shRNA-Vektoren

Es wurden je drei verschiedene siRNAs pro Kandidatengen erstellt. Für die Klonierung der siRNA wurden Oligonukleotide erstellt. Der zentrale Teil der Oligonukleotide ist die gegen das entsprechende Gen gerichtete siRNA. Geeignete Sequenzen wurden mittels einer im Internet zugänglichen Software von Dharmacon (<http://www.dharmacon.com>) identifiziert. Die vorgeschlagenen 19 Basenpaar langen Sequenzen wurden um zwei weitere Basenpaare verlängert, wobei das 3' Ende AT-reicher sein sollte um die Prozessierung im RISC-Komplex zu verbessern. An diese verlängerte siRNA schließt sich jeweils die Loopsequenz an, die für die Formierung der Hairpinstruktur essentiell ist, und daran die antisense-Sequenz der verlängerten siRNA. Für die Klonierung der siRNA-Kassette in den Expressionsvektor wird am Ende noch eine Sequenz für das Restriktionsenzym *XhoI* angefügt. Für den unteren Primer befindet sich die Restriktionsschnittstelle am Anfang der Sequenz.

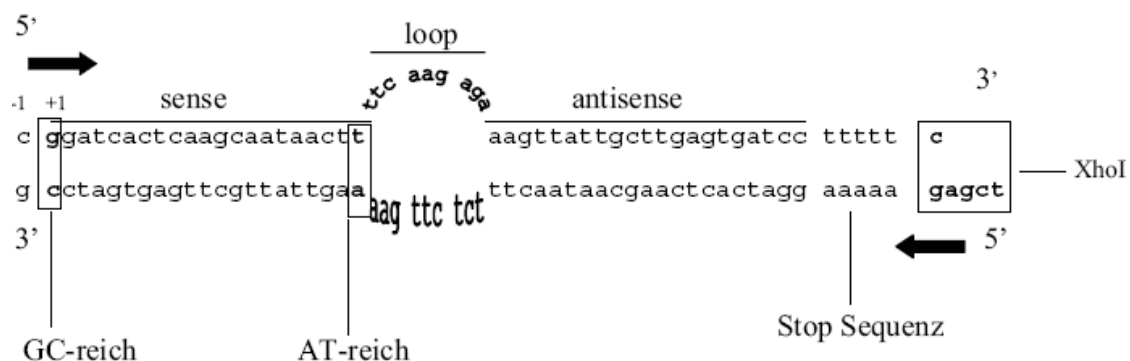


Abbildung 39: Design der Oligonukleotide für shRNA-Vektoren (nach T.Thiel, Diplomarbeit)

Die Oligonukleotide wurden aneinandergelagert, über ein Agarosegel aufgereinigt und in den vorher durch das Enzym *XhoI* linearisierten pBJ3-PincU6-ngfr* Vektor ligiert. Der Ligationsansatz wurde in DH5alpha Bakterien transformiert und die DNA mittels des JetStar Kits aufgereinigt.

6.3 Proteinbiochemische Analysen

Die Analyse von Proteinen erfolgte mittels Westernblot-Analysen. Wenn verfügbar wurden 6×10^6 Zellen mit PBS gewaschen und in 50 μ l 2x Lämmli-Puffer (Laemmli, 1970) lysiert. Bei geringeren Zellzahlen wurde entsprechend weniger Lämmli Puffer verwendet, mindestens jedoch 30 μ l. Dem Puffer wurden zusätzlich Proteaseinhibitoren zugefügt (Protease Inhibitor Cocktail complete Mini von Roche). Der Proteingehalt dieser Zelllysate wurde mit Hilfe des D_C Protein Assay von Bio-Rad (München) nach Angaben des Herstellers bestimmt. Die Proteine wurden (60 μ g Protein pro Spur) mittels Elektrophorese in 12 % SDS-Polyacrylamid-Gelen aufgetrennt und auf eine Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran transferiert. Eine Ponceaufärbung (Sigma Aldrich) wurde zur Quantifizierung der Gesamtproteinmenge durchgeführt. Nach Blocken der Membran mit 5 % Magermilch in PBS wurde die Membran über Nacht bei 4°C mit dem primären Antikörper inkubiert. Schwache Antikörper wie der gegen Bcl6 gerichtete wurden auch für längere Zeiträume inkubiert. Die Membran wurde danach mit PBS gewaschen und anschließend für 3 h bei Raumtemperatur mit dem Meerrettichperoxidase(HRP)-gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert. Nach erneutem Waschen mit PBS wurde die Chemi-Lumineszenzreaktion mit Hilfe des ECL Kits bzw. des ECL AdvanceTM Western Blotting Detection Kits (beide GE Healthcare, Freiburg) gestartet und auf ECL-Chemilumineszenzfilmen (RP New Medical X-Ray Film Blue sensitive, CEA, Schweden) visualisiert. Weitere Antikörper-Inkubationen erfolgten zumeist ohne Entfernung des vorherigen Antikörpers von der Membran.

6.4 Techniken der RNA-Analyse

6.4.1 RNA-Reinigung

Es wurden zwischen 1×10^5 und 3×10^6 Zellen in die RNA Isolation mit dem RNeasy Kit (Qiagen, Hilden) eingesetzt. Die Qualität der RNA wurde durch eine Gelelektrophorese und Detektion der ribosomalen RNA überprüft. Mittels einer photometrischen Bestimmung wurde die RNA-Konzentration quantifiziert. Anschließend wurde die RNA bei minus 80°C gelagert.

6.4.2 ReverseTranskription-PCR

Mit Hilfe der Reversen Transkriptase (RT) kann RNA in einzelsträngige cDNA transkribiert werden. Für die cDNA-Synthese wurde 1 µg Gesamt-RNA eingesetzt. Mit dem 1st Strand cDNA Synthesis Kit (Roche Applied Science, Mannheim) wurde durch die Verwendung von Oligo-p(dT)₁₅-Primern aus der Gesamt-RNA spezifisch die mRNA-Moleküle umgeschrieben. Die erhaltenen cDNA-Moleküle wurden bei minus 20°C gelagert und in die quantitativen RT-PCR-Reaktionen eingesetzt.

Reaktionsansatz		reverse Transkription	
RNA	1 µg	10min	25°C
10xPuffer	2 µl	1 Stunde	42°C
dNTP-Mix	4 µl	5min	99°C
Oligo-p(dT) ₁₅ Primer	2 µl		
RNase Inhibitor	1 µl		
AMV Reverse Transkriptase	0,8 µl		
H ₂ O	auf 20 µl auffüllen		

6.4.3 Quantitative RT-PCR

Die LightCycler-Methode nach Roche ist eine PCR, die basierend auf einer Faststart Taq DNA-Polymerase und einem dsDNA-spezifischem Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green1 arbeitet. Der SYBR Green1 Fluoreszenzfarbstoff bindet an die während der Amplifikation entstehenden Produkte und erlaubt so eine Quantifizierung.

Die verwendeten Primer-Oligonukleotide und speziellen Reaktionsbedingungen sind in Tabelle 8 aufgelistet. Für die meisten Lightcyclernanalysen wurde eine 1:10 Verdünnung der cDNA-Matrize verwendet. Bei sehr geringen mRNA-Mengen wurde die cDNA unverdünnt verwendet. Wasser diente als Negativkontrolle.

Die PCR-Reaktionen wurden in einem 10 µl Reaktionsgemisch gemäß Herstellerangaben in einem LightCycler (Roche) mit folgender Temperaturabfolge 55 Zyklen lang durchgeführt:

Denaturierung der DNA	95°C	für 10 min
Zyklische Denaturierung	95°C	für 1 s
Zyklische Anlagerung	50-65°C	für 10 s
Zyklische Verlängerung	72°C	für 1min pro 1,5 kb
Aufschmelzen	70°C bis 97°C	in 10 s
Abkühlen	40°C	für 15 s

Die Fluoreszenzzunahme wurde in jedem Amplifikationszyklus gemessen und in einem Graphen dargestellt. Ein Computerprogramm ermittelt daraus den *crossing point* (Cp), der beschreibt, nach wie viele Zyklen eine definierte Menge an PCR-Produkt synthetisiert wurde. Zur Auswertung wurde mittels einer Verdünnungsserie die Reaktionseffizienz berechnet. Dazu wurden die gemessenen Cp-Werte gegen den Logarithmus der Konzentrationen aufgetragen, um eine Eichgerade zu erhalten, aus der sich die Effizienz ermitteln lässt. Der Cp-Wert bezogen auf die Reaktionseffizienz kann auf ein Haushaltsgen normalisiert werden, um die relative mRNA Menge nach folgender Formel zu ermitteln:

$$T_{0\text{gesucht}} = \frac{(E_{\text{Haushaltsgen}})^{\text{Cp Haushaltsgen}}}{(E_{\text{gesucht}})^{\text{Cp gesucht}}}$$

In dieser Arbeit wurde das ribosomale Protein L23b als Haushaltsgen zur Normalisierung herangezogen (H. Kohlhof, Doktorarbeit). Alle mRNA-Analysen wurden mindestens doppelt durchgeführt, nach Möglichkeit innerhalb desselben Reaktionsansatzes, und daraus ein Mittelwert und eine Standardabweichung berechnet.

7 Literaturverzeichnis

- Adachi, S., Obaya, A.J., Han, Z., Ramos-Desimone, N., Wyche, J.H., and Sedivy, J.M. (2001). c-Myc is necessary for DNA damage-induced apoptosis in the G(2) phase of the cell cycle. *Mol Cell Biol* 21, 4929-4937.
- Albert, T., Urlbauer, B., Kohlhuber, F., Hammersen, B., and Eick, D. (1994). Ongoing mutations in the N-terminal domain of c-Myc affect transactivation in Burkitt's lymphoma cell lines. *Oncogene* 9, 759-763.
- Alizadeh, A.A., Eisen, M.B., Davis, R.E., Ma, C., Lossos, I.S., Rosenwald, A., Boldrick, J.C., Sabet, H., Tran, T., Yu, X., *et al.* (2000). Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 403, 503-511.
- Allman, D., Jain, A., Dent, A., Maile, R.R., Selvaggi, T., Kehry, M.R., and Staudt, L.M. (1996). BCL-6 expression during B-cell activation. *Blood* 87, 5257-5268.
- Aoufouchi, S., Faili, A., Zober, C., D'Orlando, O., Weller, S., Weill, J.C., and Reynaud, C.A. (2008). Proteasomal degradation restricts the nuclear lifespan of AID. *J Exp Med* 205, 1357-1368.
- Arakawa, H., Moldovan, G.L., Saribasak, H., Saribasak, N.N., Jentsch, S., and Buerstedde, J.M. (2006). A role for PCNA ubiquitination in immunoglobulin hypermutation. *PLoS Biol* 4, e366.
- Arakawa, H., Saribasak, H., and Buerstedde, J.M. (2004). Activation-induced cytidine deaminase initiates immunoglobulin gene conversion and hypermutation by a common intermediate. *PLoS Biol* 2, E179.
- Aspland, S.E., Bendall, H.H., and Murre, C. (2001). The role of E2A-PBX1 in leukemogenesis. *Oncogene* 20, 5708-5717.
- Bachl, J., Carlson, C., Gray-Schopfer, V., Dessing, M., and Olsson, C. (2001). Increased transcription levels induce higher mutation rates in a hypermutating cell line. *J Immunol* 166, 5051-5057.
- Bachl, J., Dessing, M., Olsson, C., von Borstel, R.C., and Steinberg, C. (1999). An experimental solution for the Luria-Delbruck fluctuation problem in measuring hypermutation rates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 6847-6849.
- Bachl, J., Ertongur, I., and Jungnickel, B. (2006). Involvement of Rad18 in somatic hypermutation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 12081-12086.
- Bachl, J., and Olsson, C. (1999). Hypermutation targets a green fluorescent protein-encoding transgene in the presence of immunoglobulin enhancers. *Eur J Immunol* 29, 1383-1389.
- Bachl, J., Steinberg, C., and Wabl, M. (1997). Critical test of hot spot motifs for immunoglobulin hypermutation. *Eur J Immunol* 27, 3398-3403.
- Bain, G., Engel, I., Robanus Maandag, E.C., te Riele, H.P., Volland, J.R., Sharp, L.L., Chun, J., Huey, B., Pinkel, D., and Murre, C. (1997). E2A deficiency leads to abnormalities in alphabeta T-cell development and to rapid development of T-cell lymphomas. *Mol Cell Biol* 17, 4782-4791.

- Bain, G., Maandag, E.C., Izon, D.J., Amsen, D., Kruisbeek, A.M., Weintraub, B.C., Krop, I., Schlissel, M.S., Feeney, A.J., van Roon, M., and et al. (1994). E2A proteins are required for proper B cell development and initiation of immunoglobulin gene rearrangements. *Cell* 79, 885-892.
- Baron, B.W., Anastasi, J., Thirman, M.J., Furukawa, Y., Fears, S., Kim, D.C., Simone, F., Birkenbach, M., Montag, A., Sadhu, A., *et al.* (2002). The human programmed cell death-2 (PDCD2) gene is a target of BCL6 repression: implications for a role of BCL6 in the down-regulation of apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 2860-2865.
- Baron, B.W., Zeleznik-Le, N., Baron, M.J., Theisler, C., Huo, D., Krasowski, M.D., Thirman, M.J., Baron, R.M., and Baron, J.M. (2007). Repression of the PDCD2 gene by BCL6 and the implications for the pathogenesis of human B and T cell lymphomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 7449-7454.
- Bartholdy, B., Du Roure, C., Bordon, A., Emslie, D., Corcoran, L.M., and Matthias, P. (2006). The Ets factor Spi-B is a direct critical target of the coactivator OBF-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 11665-11670.
- Basu, U., Chaudhuri, J., Alpert, C., Dutt, S., Ranganath, S., Li, G., Schrum, J.P., Manis, J.P., and Alt, F.W. (2005). The AID antibody diversification enzyme is regulated by protein kinase A phosphorylation. *Nature* 438, 508-511.
- Bellan, C., Lazzi, S., Hummel, M., Palumbo, N., de Santi, M., Amato, T., Nyagol, J., Sabattini, E., Lazure, T., Pileri, S.A., *et al.* (2005). Immunoglobulin gene analysis reveals 2 distinct cells of origin for EBV-positive and EBV-negative Burkitt lymphomas. *Blood* 106, 1031-1036.
- Bemark, M., and Neuberger, M.S. (2003). By-products of immunoglobulin somatic hypermutation. *Genes Chromosomes Cancer* 38, 32-39.
- Betz, A.G., Milstein, C., Gonzalez-Fernandez, A., Pannell, R., Larson, T., and Neuberger, M.S. (1994). Elements regulating somatic hypermutation of an immunoglobulin kappa gene: critical role for the intron enhancer/matrix attachment region. *Cell* 77, 239-248.
- Betz, A.G., Rada, C., Pannell, R., Milstein, C., and Neuberger, M.S. (1993). Passenger transgenes reveal intrinsic specificity of the antibody hypermutation mechanism: clustering, polarity, and specific hot spots. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 2385-2388.
- Bornkamm, G.W., Berens, C., Kuklik-Roos, C., Bechet, J.M., Laux, G., Bachl, J., Korndoerfer, M., Schlee, M., Holz, M., Malamoussi, A., *et al.* (2005). Stringent doxycycline-dependent control of gene activities using an episomal one-vector system. *Nucleic Acids Res* 33, e137.
- Boxer, L.M., and Dang, C.V. (2001). Translocations involving c-myc and c-myc function. *Oncogene* 20, 5595-5610.
- Bransteitter, R., Pham, P., Scharff, M.D., and Goodman, M.F. (2003). Activation-induced cytidine deaminase deaminates deoxycytidine on single-stranded DNA but requires the action of RNase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 4102-4107.

- Brar, S.S., Watson, M., and Diaz, M. (2004). Activation-induced cytosine deaminase (AID) is actively exported out of the nucleus but retained by the induction of DNA breaks. *J Biol Chem* 279, 26395-26401.
- Buerstedde, J.M., and Arakawa, H. (2006). Immunoglobulin gene conversion or hypermutation: that's the question. *Subcell Biochem* 40, 11-24.
- Buerstedde, J.M., Reynaud, C.A., Humphries, E.H., Olson, W., Ewert, D.L., and Weill, J.C. (1990). Light chain gene conversion continues at high rate in an ALV-induced cell line. *EMBO J* 9, 921-927.
- Busslinger, M., Klix, N., Pfeffer, P., Graninger, P.G., and Kozmik, Z. (1996). Deregulation of PAX-5 by translocation of the Emu enhancer of the IgH locus adjacent to two alternative PAX-5 promoters in a diffuse large-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 6129-6134.
- Butcher, E.C., Rouse, R.V., Coffman, R.L., Nottenburg, C.N., Hardy, R.R., and Weissman, I.L. (1982). Surface phenotype of Peyer's patch germinal center cells: implications for the role of germinal centers in B cell differentiation. *J Immunol* 129, 2698-2707.
- Cannon, J.P., Haire, R.N., Rast, J.P., and Litman, G.W. (2004). The phylogenetic origins of the antigen-binding receptors and somatic diversification mechanisms. *Immunol Rev* 200, 12-22.
- Capello, D., Cerri, M., Muti, G., Berra, E., Oreste, P., Deambrogi, C., Rossi, D., Dotti, G., Conconi, A., Vigano, M., *et al.* (2003). Molecular histogenesis of posttransplantation lymphoproliferative disorders. *Blood* 102, 3775-3785.
- Cario, G., Stadt, U.Z., Reiter, A., Welte, K., and Sykora, K.W. (2000). Variant translocations in sporadic Burkitt's lymphoma detected in fresh tumour material: analysis of three cases. *Br J Haematol* 110, 537-546.
- Casola, S., Cattoretti, G., Uyttersprot, N., Koralov, S.B., Seagal, J., Hao, Z., Waisman, A., Egert, A., Ghitza, D., and Rajewsky, K. (2006). Tracking germinal center B cells expressing germ-line immunoglobulin gamma1 transcripts by conditional gene targeting. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 7396-7401.
- Casola, S., and Rajewsky, K. (2006). B cell recruitment and selection in mouse GALT germinal centers. *Curr Top Microbiol Immunol* 308, 155-171.
- Cattoretti, G., Buttner, M., Shaknovich, R., Kremmer, E., Alobeid, B., and Niedobitek, G. (2006a). Nuclear and cytoplasmic AID in extrafollicular and germinal center B cells. *Blood* 107, 3967-3975.
- Cattoretti, G., Shaknovich, R., Smith, P.M., Jack, H.M., Murty, V.V., and Alobeid, B. (2006b). Stages of germinal center transit are defined by B cell transcription factor coexpression and relative abundance. *J Immunol* 177, 6930-6939.
- Cazzaniga, G., Daniotti, M., Tosi, S., Giudici, G., Aloisi, A., Pogliani, E., Kearney, L., and Biondi, A. (2001). The paired box domain gene PAX5 is fused to ETV6/TEL in an acute lymphoblastic leukemia case. *Cancer Res* 61, 4666-4670.
- Chan, M.A., Stein, L.D., Dosch, H.M., and Sigal, N.H. (1986). Heterogeneity of EBV-transformable human B lymphocyte populations. *J Immunol* 136, 106-112.

- Chaudhuri, J., Tian, M., Khuong, C., Chua, K., Pinaud, E., and Alt, F.W. (2003). Transcription-targeted DNA deamination by the AID antibody diversification enzyme. *Nature* 422, 726-730.
- Chen, Y.W., Hu, X.T., Liang, A.C., Au, W.Y., So, C.C., Wong, M.L., Shen, L., Tao, Q., Chu, K.M., Kwong, Y.L., *et al.* (2006). High BCL6 expression predicts better prognosis, independent of BCL6 translocation status, translocation partner, or BCL6-deregulating mutations, in gastric lymphoma. *Blood* 108, 2373-2383.
- Chiang, M.Y., and Monroe, J.G. (2001). Role for transcription Pax5A factor in maintaining commitment to the B cell lineage by selective inhibition of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor expression. *J Immunol* 166, 6091-6098.
- Cleary, M.L., Meeker, T.C., Levy, S., Lee, E., Trela, M., Sklar, J., and Levy, R. (1986). Clustering of extensive somatic mutations in the variable region of an immunoglobulin heavy chain gene from a human B cell lymphoma. *Cell* 44, 97-106.
- Cobaleda, C., and Busslinger, M. (2008). Developmental plasticity of lymphocytes. *Curr Opin Immunol* 20, 139-148.
- Cole, M.D., and McMahon, S.B. (1999). The Myc oncoprotein: a critical evaluation of transactivation and target gene regulation. *Oncogene* 18, 2916-2924.
- Conlon, T.M., and Meyer, K.B. (2006). The chicken Ig light chain 3'-enhancer is essential for gene expression and regulates gene conversion via the transcription factor E2A. *Eur J Immunol* 36, 139-148.
- Cozma, D., Yu, D., Hodawadekar, S., Azvolinsky, A., Grande, S., Tobias, J.W., Metzgar, M.H., Paterson, J., Erikson, J., Marafioti, T., *et al.* (2007). B cell activator PAX5 promotes lymphomagenesis through stimulation of B cell receptor signaling. *J Clin Invest* 117, 2602-2610.
- Cutrona, G., Dono, M., Pastorino, S., Ulivi, M., Burgio, V.L., Zupo, S., Roncella, S., and Ferrarini, M. (1997). The propensity to apoptosis of centrocytes and centroblasts correlates with elevated levels of intracellular myc protein. *Eur J Immunol* 27, 234-238.
- Dang, C.V. (1999). c-Myc target genes involved in cell growth, apoptosis, and metabolism. *Mol Cell Biol* 19, 1-11.
- Dave, S.S., Fu, K., Wright, G.W., Lam, L.T., Kluin, P., Boerma, E.J., Greiner, T.C., Weisenburger, D.D., Rosenwald, A., Ott, G., *et al.* (2006). Molecular diagnosis of Burkitt's lymphoma. *N Engl J Med* 354, 2431-2442.
- Davis, A.C., Wims, M., Spotts, G.D., Hann, S.R., and Bradley, A. (1993). A null c-myc mutation causes lethality before 10.5 days of gestation in homozygotes and reduced fertility in heterozygous female mice. *Genes Dev* 7, 671-682.
- Dedeoglu, F., Horwitz, B., Chaudhuri, J., Alt, F.W., and Geha, R.S. (2004). Induction of activation-induced cytidine deaminase gene expression by IL-4 and CD40 ligation is dependent on STAT6 and NFkappaB. *Int Immunol* 16, 395-404.
- Delbos, F., Aoufouchi, S., Faili, A., Weill, J.C., and Reynaud, C.A. (2007). DNA polymerase eta is the sole contributor of A/T modifications during immunoglobulin gene hypermutation in the mouse. *J Exp Med* 204, 17-23.

- Denepoux, S., Razanajaona, D., Blanchard, D., Meffre, G., Capra, J.D., Banchereau, J., and Lebecque, S. (1997). Induction of somatic mutation in a human B cell line in vitro. *Immunity* 6, 35-46.
- Dent, A.L., Vasanwala, F.H., and Toney, L.M. (2002). Regulation of gene expression by the proto-oncogene BCL-6. *Crit Rev Oncol Hematol* 41, 1-9.
- Di Noia, J.M., and Neuberger, M.S. (2007). Molecular mechanisms of antibody somatic hypermutation. *Annu Rev Biochem* 76, 1-22.
- Diaz, M., Verkoczy, L.K., Flajnik, M.F., and Klinman, N.R. (2001). Decreased frequency of somatic hypermutation and impaired affinity maturation but intact germinal center formation in mice expressing antisense RNA to DNA polymerase zeta. *J Immunol* 167, 327-335.
- Dominguez-Sola, D., Ying, C.Y., Grandori, C., Ruggiero, L., Chen, B., Li, M., Galloway, D.A., Gu, W., Gautier, J., and Dalla-Favera, R. (2007). Non-transcriptional control of DNA replication by c-Myc. *Nature* 448, 445-451.
- Dorsett, Y., McBride, K.M., Jankovic, M., Gazumyan, A., Thai, T.H., Robbiani, D.F., Di Virgilio, M., San-Martin, B.R., Heidkamp, G., Schwickert, T.A., *et al.* (2008). MicroRNA-155 suppresses activation-induced cytidine deaminase-mediated Myc-Igh translocation. *Immunity* 28, 630-638.
- Dorsett, Y., Robbiani, D.F., Jankovic, M., Reina-San-Martin, B., Eisenreich, T.R., and Nussenzweig, M.C. (2007). A role for AID in chromosome translocations between c-myc and the IgH variable region. *J Exp Med* 204, 2225-2232.
- Downs, J.A., Nussenzweig, M.C., and Nussenzweig, A. (2007). Chromatin dynamics and the preservation of genetic information. *Nature* 447, 951-958.
- Edry, E., and Melamed, D. (2007). Class switch recombination: a friend and a foe. *Clin Immunol* 123, 244-251.
- Endo, Y., Marusawa, H., Kinoshita, K., Morisawa, T., Sakurai, T., Okazaki, I.M., Watashi, K., Shimotohno, K., Honjo, T., and Chiba, T. (2007). Expression of activation-induced cytidine deaminase in human hepatocytes via NF-kappaB signaling. *Oncogene* 26, 5587-5595.
- Engel, I., and Murre, C. (1999). Ectopic expression of E47 or E12 promotes the death of E2A-deficient lymphomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 996-1001.
- Faili, A., Aoufouchi, S., Flatter, E., Gueranger, Q., Reynaud, C.A., and Weill, J.C. (2002a). Induction of somatic hypermutation in immunoglobulin genes is dependent on DNA polymerase iota. *Nature* 419, 944-947.
- Faili, A., Aoufouchi, S., Gueranger, Q., Zober, C., Leon, A., Bertocci, B., Weill, J.C., and Reynaud, C.A. (2002b). AID-dependent somatic hypermutation occurs as a DNA single-strand event in the BL2 cell line. *Nat Immunol* 3, 815-821.
- Fernandez, P.C., Frank, S.R., Wang, L., Schroeder, M., Liu, S., Greene, J., Cocito, A., and Amati, B. (2003). Genomic targets of the human c-Myc protein. *Genes Dev* 17, 1115-1129.
- Fukita, Y., Jacobs, H., and Rajewsky, K. (1998). Somatic hypermutation in the heavy chain locus correlates with transcription. *Immunity* 9, 105-114.

- Fuxa, M., Skok, J., Souabni, A., Salvagiotto, G., Roldan, E., and Busslinger, M. (2004). Pax5 induces V-to-DJ rearrangements and locus contraction of the immunoglobulin heavy-chain gene. *Genes Dev* 18, 411-422.
- Gavioli, R., Frisan, T., Vertuani, S., Bornkamm, G.W., and Masucci, M.G. (2001). c-myc overexpression activates alternative pathways for intracellular proteolysis in lymphoma cells. *Nat Cell Biol* 3, 283-288.
- Gelmann, E.P., Psallidopoulos, M.C., Papas, T.S., and Dalla-Favera, R. (1983). Identification of reciprocal translocation sites within the c-myc oncogene and immunoglobulin mu locus in a Burkitt lymphoma. *Nature* 306, 799-803.
- Golay, J., Broccoli, V., Lamorte, G., Bifulco, C., Parravicini, C., Pizzey, A., Thomas, N.S., Delia, D., Ferrauti, P., Vitolo, D., and Introna, M. (1998). The A-Myb transcription factor is a marker of centroblasts in vivo. *J Immunol* 160, 2786-2793.
- Goldfarb, A.N., Flores, J.P., and Lewandowska, K. (1996). Involvement of the E2A basic helix-loop-helix protein in immunoglobulin heavy chain class switching. *Mol Immunol* 33, 947-956.
- Golding, G.B., Gearhart, P.J., and Glickman, B.W. (1987). Patterns of somatic mutations in immunoglobulin variable genes. *Genetics* 115, 169-176.
- Gonda, H., Sugai, M., Nambu, Y., Katakai, T., Agata, Y., Mori, K.J., Yokota, Y., and Shimizu, A. (2003). The balance between Pax5 and Id2 activities is the key to AID gene expression. *J Exp Med* 198, 1427-1437.
- Goodman, M.F., and Tippin, B. (2000). Sloppier copier DNA polymerases involved in genome repair. *Curr Opin Genet Dev* 10, 162-168.
- Goossens, T., Klein, U., and Kuppers, R. (1998). Frequent occurrence of deletions and duplications during somatic hypermutation: implications for oncogene translocations and heavy chain disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 2463-2468.
- Gray, D. (1991). Understanding germinal centres. *Res Immunol* 142, 237-242.
- Gregory, M.A., and Hann, S.R. (2000). c-Myc proteolysis by the ubiquitin-proteasome pathway: stabilization of c-Myc in Burkitt's lymphoma cells. *Mol Cell Biol* 20, 2423-2435.
- Hermeking, H., Rago, C., Schuhmacher, M., Li, Q., Barrett, J.F., Obaya, A.J., O'Connell, B.C., Mateyak, M.K., Tam, W., Kohlhuber, F., *et al.* (2000). Identification of CDK4 as a target of c-MYC. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 2229-2234.
- HogerCorp, C.M., and Borrebaeck, C.A. (2006). The human CD77- B cell population represents a heterogeneous subset of cells comprising centroblasts, centrocytes, and plasmablasts, prompting phenotypical revision. *J Immunol* 177, 4341-4349.
- Hollowood, K., and Goodlad, J.R. (1998). Germinal centre cell kinetics. *J Pathol* 185, 229-233.
- Holmes, M.L., Pridans, C., and Nutt, S.L. (2008). The regulation of the B-cell gene expression programme by Pax5. *Immunol Cell Biol* 86, 47-53.

- Horowitz, M.C., Xi, Y., Pflugh, D.L., Hesslein, D.G., Schatz, D.G., Lorenzo, J.A., and Bothwell, A.L. (2004). Pax5-deficient mice exhibit early onset osteopenia with increased osteoclast progenitors. *J Immunol* 173, 6583-6591.
- Iqbal, J., Greiner, T.C., Patel, K., Dave, B.J., Smith, L., Ji, J., Wright, G., Sanger, W.G., Pickering, D.L., Jain, S., *et al.* (2007). Distinctive patterns of BCL6 molecular alterations and their functional consequences in different subgroups of diffuse large B-cell lymphoma. *Leukemia* 21, 2332-2343.
- Jacob, J., Kassir, R., and Kelsoe, G. (1991). In situ studies of the primary immune response to (4-hydroxy-3-nitrophenyl)acetyl. I. The architecture and dynamics of responding cell populations. *J Exp Med* 173, 1165-1175.
- Jacob, J., and Kelsoe, G. (1992). In situ studies of the primary immune response to (4-hydroxy-3-nitrophenyl)acetyl. II. A common clonal origin for periarteriolar lymphoid sheath-associated foci and germinal centers. *J Exp Med* 176, 679-687.
- Janeway, C.A., Jr., and Medzhitov, R. (2002). Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 20, 197-216.
- Jansen, J.G., Langerak, P., Tsaalbi-Shtylik, A., van den Berk, P., Jacobs, H., and de Wind, N. (2006). Strand-biased defect in C/G transversions in hypermutating immunoglobulin genes in Rev1-deficient mice. *J Exp Med* 203, 319-323.
- Jochner, N., Eick, D., Zimmer-Strobl, U., Pawlita, M., Bornkamm, G.W., and Kempkes, B. (1996). Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 is a transcriptional suppressor of the immunoglobulin mu gene: implications for the expression of the translocated c-myc gene in Burkitt's lymphoma cells. *Embo J* 15, 375-382.
- Johnson, K., Shapiro-Shelef, M., Tunyaplin, C., and Calame, K. (2005). Regulatory events in early and late B-cell differentiation. *Mol Immunol* 42, 749-761.
- Johnston, J.M., Yu, M.T., and Carroll, W.L. (1991). c-myc hypermutation is ongoing in endemic, but not all Burkitt's lymphoma. *Blood* 78, 2419-2425.
- Jonveaux, P., and Berger, R. (1991). Rearrangement of the E2A gene in the t (1;19) acute lymphoblastic leukemia. *Nouv Rev Fr Hematol* 33, 547-549.
- Kanzler, H., Kuppers, R., Hansmann, M.L., and Rajewsky, K. (1996). Hodgkin and Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease represent the outgrowth of a dominant tumor clone derived from (crippled) germinal center B cells. *J Exp Med* 184, 1495-1505.
- Kee, B.L., Quong, M.W., and Murre, C. (2000). E2A proteins: essential regulators at multiple stages of B-cell development. *Immunol Rev* 175, 138-149.
- Kelly, G., Bell, A., and Rickinson, A. (2002). Epstein-Barr virus-associated Burkitt lymphomagenesis selects for downregulation of the nuclear antigen EBNA2. *Nat Med* 8, 1098-1104.
- Kelly, G.L., and Rickinson, A.B. (2007). Burkitt lymphoma: revisiting the pathogenesis of a virus-associated malignancy. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2007, 277-284.
- Kelsoe, G. (1995). The germinal center reaction. *Immunol Today* 16, 324-326.

- Kempkes, B., Spitkovsky, D., Jansen-Durr, P., Ellwart, J.W., Kremmer, E., Delecluse, H.J., Rottenberger, C., Bornkamm, G.W., and Hammerschmidt, W. (1995). B-cell proliferation and induction of early G1-regulating proteins by Epstein-Barr virus mutants conditional for EBNA2. *EMBO J* 14, 88-96.
- Khan, G., Miyashita, E.M., Yang, B., Babcock, G.J., and Thorley-Lawson, D.A. (1996). Is EBV persistence in vivo a model for B cell homeostasis? *Immunity* 5, 173-179.
- Kiessling, A., Sperl, B., Hollis, A., Eick, D., and Berg, T. (2006). Selective inhibition of c-Myc/Max dimerization and DNA binding by small molecules. *Chem Biol* 13, 745-751.
- Kim, C.J., Song, J.H., Cho, Y.G., Cao, Z., Kim, S.Y., Nam, S.W., Lee, J.Y., and Park, W.S. (2007a). Activation-induced cytidine deaminase expression in gastric cancer. *Tumour Biol* 28, 333-339.
- Kim, J.W., Gao, P., Liu, Y.C., Semenza, G.L., and Dang, C.V. (2007b). Hypoxia-inducible factor 1 and dysregulated c-Myc cooperatively induce vascular endothelial growth factor and metabolic switches hexokinase 2 and pyruvate dehydrogenase kinase 1. *Mol Cell Biol* 27, 7381-7393.
- King, A.M., Van der Put, E., Blomberg, B.B., and Riley, R.L. (2007). Accelerated Notch-dependent degradation of E47 proteins in aged B cell precursors is associated with increased ERK MAPK activation. *J Immunol* 178, 3521-3529.
- Kitao, H., Kimura, M., Yamamoto, K., Seo, H., Namikoshi, K., Agata, Y., Ohta, K., and Takata, M. (2008). Regulation of histone H4 acetylation by transcription factor E2A in Ig gene conversion. *Int Immunol* 20, 277-284.
- Klein, U., Tu, Y., Stolovitzky, G.A., Keller, J.L., Haddad, J., Jr., Miljkovic, V., Cattoretti, G., Califano, A., and Dalla-Favera, R. (2003). Transcriptional analysis of the B cell germinal center reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 2639-2644.
- Kosco, M.H., Szakal, A.K., and Tew, J.G. (1988). In vivo obtained antigen presented by germinal center B cells to T cells in vitro. *J Immunol* 140, 354-360.
- Kotani, A., Kakazu, N., Tsuruyama, T., Okazaki, I.M., Muramatsu, M., Kinoshita, K., Nagaoka, H., Yabe, D., and Honjo, T. (2007). Activation-induced cytidine deaminase (AID) promotes B cell lymphomagenesis in Emu-cmyc transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 1616-1620.
- Kotani, A., Okazaki, I.M., Muramatsu, M., Kinoshita, K., Begum, N.A., Nakajima, T., Saito, H., and Honjo, T. (2005). A target selection of somatic hypermutations is regulated similarly between T and B cells upon activation-induced cytidine deaminase expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 4506-4511.
- Kovalchuk, A.L., Qi, C.F., Torrey, T.A., Taddesse-Heath, L., Feigenbaum, L., Park, S.S., Gerbitz, A., Klobeck, G., Hoernagel, K., Polack, A., *et al.* (2000). Burkitt lymphoma in the mouse. *J Exp Med* 192, 1183-1190.
- Kozmik, Z., Wang, S., Dorfler, P., Adams, B., and Busslinger, M. (1992). The promoter of the CD19 gene is a target for the B-cell-specific transcription factor BSAP. *Mol Cell Biol* 12, 2662-2672.

- Kraus, M., Alimzhanov, M.B., Rajewsky, N., and Rajewsky, K. (2004). Survival of resting mature B lymphocytes depends on BCR signaling via the Igalpha/beta heterodimer. *Cell* 117, 787-800.
- Krenacs, L., Himmelmann, A.W., Quintanilla-Martinez, L., Fest, T., Riva, A., Wellmann, A., Bagdi, E., Kehrl, J.H., Jaffe, E.S., and Raffeld, M. (1998). Transcription factor B-cell-specific activator protein (BSAP) is differentially expressed in B cells and in subsets of B-cell lymphomas. *Blood* 92, 1308-1316.
- Kuppers, R. (2003). B cells under influence: transformation of B cells by Epstein-Barr virus. *Nat Rev Immunol* 3, 801-812.
- Küppers, R. (2005). Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis. *Nat Rev Cancer* 5, 251-262.
- Küppers, R., Klein, U., Hansmann, M.L., and Rajewsky, K. (1999). Cellular origin of human B-cell lymphomas. *N Engl J Med* 341, 1520-1529.
- Kuppers, R., Scherwing, I., Brauninger, A., Rajewsky, K., and Hansmann, M.L. (2002). Biology of Hodgkin's lymphoma. *Ann Oncol* 13 Suppl 1, 11-18.
- Kuppers, R., Zhao, M., Hansmann, M.L., and Rajewsky, K. (1993). Tracing B cell development in human germinal centres by molecular analysis of single cells picked from histological sections. *Embo J* 12, 4955-4967.
- Kwon, K., Hutter, C., Sun, Q., Bilic, I., Cobaleda, C., Malin, S., and Busslinger, M. (2008). Instructive role of the transcription factor E2A in early B lymphopoiesis and germinal center B cell development. *Immunity* 28, 751-762.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lam, K.P., Kuhn, R., and Rajewsky, K. (1997). In vivo ablation of surface immunoglobulin on mature B cells by inducible gene targeting results in rapid cell death. *Cell* 90, 1073-1083.
- Langerak, P., Nygren, A.O., Krijger, P.H., van den Berk, P.C., and Jacobs, H. (2007). A/T mutagenesis in hypermutated immunoglobulin genes strongly depends on PCNAK164 modification. *J Exp Med* 204, 1989-1998.
- Lebecque, S.G., and Gearhart, P.J. (1990). Boundaries of somatic mutation in rearranged immunoglobulin genes: 5' boundary is near the promoter, and 3' boundary is approximately 1 kb from V(D)J gene. *J Exp Med* 172, 1717-1727.
- Lenz, G., Nagel, I., Siebert, R., Roschke, A.V., Sanger, W., Wright, G.W., Dave, S.S., Tan, B., Zhao, H., Rosenwald, A., *et al.* (2007). Aberrant immunoglobulin class switch recombination and switch translocations in activated B cell-like diffuse large B cell lymphoma. *J Exp Med* 204, 633-643.
- Li, F., Wang, Y., Zeller, K.I., Potter, J.J., Wonsey, D.R., O'Donnell, K.A., Kim, J.W., Yustein, J.T., Lee, L.A., and Dang, C.V. (2005). Myc stimulates nuclearly encoded mitochondrial genes and mitochondrial biogenesis. *Mol Cell Biol* 25, 6225-6234.

- Lieber, M.R., Yu, K., and Raghavan, S.C. (2006). Roles of nonhomologous DNA end joining, V(D)J recombination, and class switch recombination in chromosomal translocations. *DNA Repair (Amst)* 5, 1234-1245.
- Lindsay, M.A. (2008). microRNAs and the immune response. *Trends Immunol* 29, 343-351.
- Liso, A., Capello, D., Marafioti, T., Tiacci, E., Cerri, M., Distler, V., Paulli, M., Carbone, A., Delsol, G., Campo, E., *et al.* (2006). Aberrant somatic hypermutation in tumor cells of nodular-lymphocyte-predominant and classic Hodgkin lymphoma. *Blood* 108, 1013-1020.
- Liu, M., Duke, J.L., Richter, D.J., Vinuesa, C.G., Goodnow, C.C., Kleinstein, S.H., and Schatz, D.G. (2008a). Two levels of protection for the B cell genome during somatic hypermutation. *Nature* 451, 841-845.
- Liu, Y.C., Li, F., Handler, J., Huang, C.R., Xiang, Y., Neretti, N., Sedivy, J.M., Zeller, K.I., and Dang, C.V. (2008b). Global regulation of nucleotide biosynthetic genes by c-Myc. *PLoS ONE* 3, e2722.
- Liu, Y.J., and Arpin, C. (1997). Germinal center development. *Immunol Rev* 156, 111-126.
- Liu, Y.J., Malisan, F., de Bouteiller, O., Guret, C., Lebecque, S., Banchereau, J., Mills, F.C., Max, E.E., and Martinez-Valdez, H. (1996). Within germinal centers, isotype switching of immunoglobulin genes occurs after the onset of somatic mutation. *Immunity* 4, 241-250.
- Lossos, I.S., Alizadeh, A.A., Eisen, M.B., Chan, W.C., Brown, P.O., Botstein, D., Staudt, L.M., and Levy, R. (2000). Ongoing immunoglobulin somatic mutation in germinal center B cell-like but not in activated B cell-like diffuse large cell lymphomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 10209-10213.
- MacLennan, I.C. (1994). Germinal centers. *Annu Rev Immunol* 12, 117-139.
- Mancao, C., Altmann, M., Jungnickel, B., and Hammerschmidt, W. (2005). Rescue of "crippled" germinal center B cells from apoptosis by Epstein-Barr virus. *Blood* 106, 4339-4344.
- Martinez-Valdez, H., Guret, C., de Bouteiller, O., Fugier, I., Banchereau, J., and Liu, Y.J. (1996). Human germinal center B cells express the apoptosis-inducing genes Fas, c-myc, P53, and Bax but not the survival gene bcl-2. *J Exp Med* 183, 971-977.
- Martomo, S.A., Saribasak, H., Yokoi, M., Hanaoka, F., and Gearhart, P.J. (2008). Reevaluation of the role of DNA polymerase theta in somatic hypermutation of immunoglobulin genes. *DNA Repair (Amst)* 7, 1603-1608.
- Matsumoto, Y., Marusawa, H., Kinoshita, K., Endo, Y., Kou, T., Morisawa, T., Azuma, T., Okazaki, I.M., Honjo, T., and Chiba, T. (2007). *Helicobacter pylori* infection triggers aberrant expression of activation-induced cytidine deaminase in gastric epithelium. *Nat Med* 13, 470-476.
- Matthias, P., and Rolink, A.G. (2005). Transcriptional networks in developing and mature B cells. *Nat Rev Immunol* 5, 497-508.
- McBride, K.M., Barreto, V., Ramiro, A.R., Stavropoulos, P., and Nussenzweig, M.C. (2004). Somatic hypermutation is limited by CRM1-dependent nuclear export of activation-induced deaminase. *J Exp Med* 199, 1235-1244.

- McBride, K.M., Gazumyan, A., Woo, E.M., Barreto, V.M., Robbiani, D.F., Chait, B.T., and Nussenzweig, M.C. (2006). Regulation of hypermutation by activation-induced cytidine deaminase phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* *103*, 8798-8803.
- McGhee, J.R. (2005). Peyer's patch germinal centers: the elusive switch site for IgA. *J Immunol* *175*, 1361-1362.
- McKean, D., Huppi, K., Bell, M., Staudt, L., Gerhard, W., and Weigert, M. (1984). Generation of antibody diversity in the immune response of BALB/c mice to influenza virus hemagglutinin. *Proc Natl Acad Sci U S A* *81*, 3180-3184.
- Melnick, A. (2005). Reprogramming specific gene expression pathways in B-cell lymphomas. *Cell Cycle* *4*, 239-241.
- Mezquita, P., Parghi, S.S., Brandvold, K.A., and Ruddell, A. (2005). Myc regulates VEGF production in B cells by stimulating initiation of VEGF mRNA translation. *Oncogene* *24*, 889-901.
- Michael, N., Shen, H.M., Longerich, S., Kim, N., Longacre, A., and Storb, U. (2003). The E box motif CAGGTG enhances somatic hypermutation without enhancing transcription. *Immunity* *19*, 235-242.
- Muramatsu, M., Kinoshita, K., Fagarasan, S., Yamada, S., Shinkai, Y., and Honjo, T. (2000). Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell* *102*, 553-563.
- Muramatsu, M., Sankaranand, V.S., Anant, S., Sugai, M., Kinoshita, K., Davidson, N.O., and Honjo, T. (1999). Specific expression of activation-induced cytidine deaminase (AID), a novel member of the RNA-editing deaminase family in germinal center B cells. *J Biol Chem* *274*, 18470-18476.
- Murre, C. (2005). Helix-loop-helix proteins and lymphocyte development. *Nat Immunol* *6*, 1079-1086.
- Muschen, M., Re, D., Jungnickel, B., Diehl, V., Rajewsky, K., and Kuppers, R. (2000). Somatic mutation of the CD95 gene in human B cells as a side-effect of the germinal center reaction. *J Exp Med* *192*, 1833-1840.
- Muto, T., Muramatsu, M., Taniwaki, M., Kinoshita, K., and Honjo, T. (2000). Isolation, tissue distribution, and chromosomal localization of the human activation-induced cytidine deaminase (AID) gene. *Genomics* *68*, 85-88.
- Muto, T., Okazaki, I.M., Yamada, S., Tanaka, Y., Kinoshita, K., Muramatsu, M., Nagaoka, H., and Honjo, T. (2006). Negative regulation of activation-induced cytidine deaminase in B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *103*, 2752-2757.
- Nakayama, Y., Stabach, P., Maher, S.E., Mahajan, M.C., Masiar, P., Liao, C., Zhang, X., Ye, Z.J., Tuck, D., Bothwell, A.L., *et al.* (2006). A limited number of genes are involved in the differentiation of germinal center B cells. *J Cell Biochem* *99*, 1308-1325.
- Nambu, Y., Sugai, M., Gonda, H., Lee, C.G., Katakai, T., Agata, Y., Yokota, Y., and Shimizu, A. (2003). Transcription-coupled events associating with immunoglobulin switch region chromatin. *Science* *302*, 2137-2140.

- Neiman, P.E., Ruddell, A., Jasoni, C., Loring, G., Thomas, S.J., Brandvold, K.A., Lee, R., Burnside, J., and Delrow, J. (2001). Analysis of gene expression during myc oncogene-induced lymphomagenesis in the bursa of Fabricius. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 6378-6383.
- Nera, K.P., Kohonen, P., Narvi, E., Peippo, A., Mustonen, L., Terho, P., Koskela, K., Buerstedde, J.M., and Lassila, O. (2006). Loss of Pax5 promotes plasma cell differentiation. *Immunity* 24, 283-293.
- Nie, L., Perry, S.S., Zhao, Y., Huang, J., Kincade, P.W., Farrar, M.A., and Sun, X.H. (2008). Regulation of lymphocyte development by cell-type-specific interpretation of Notch signals. *Mol Cell Biol* 28, 2078-2090.
- Nie, L., Xu, M., Vladimirova, A., and Sun, X.H. (2003). Notch-induced E2A ubiquitination and degradation are controlled by MAP kinase activities. *EMBO J* 22, 5780-5792.
- Nikolajczyk, B.S., Sardi, S.H., Tumang, J.R., and Ganley-Leal, L.M. (2007). Immunoglobulin kappa enhancers are differentially regulated at the level of chromatin structure. *Mol Immunol* 44, 3407-3415.
- Niu, H. (2002). The proto-oncogene BCL-6 in normal and malignant B cell development. *Hematol Oncol* 20, 155-166.
- Niu, H., Ye, B.H., and Dalla-Favera, R. (1998). Antigen receptor signaling induces MAP kinase-mediated phosphorylation and degradation of the BCL-6 transcription factor. *Genes Dev* 12, 1953-1961.
- O'Neil, J., Billa, M., Oikemus, S., and Kelliher, M. (2001). The DNA binding activity of TAL-1 is not required to induce leukemia/lymphoma in mice. *Oncogene* 20, 3897-3905.
- Oberdoerffer, P., Kanellopoulou, C., Heissmeyer, V., Paepfer, C., Borowski, C., Aifantis, I., Rao, A., and Rajewsky, K. (2005). Efficiency of RNA interference in the mouse hematopoietic system varies between cell types and developmental stages. *Mol Cell Biol* 25, 3896-3905.
- Odegard, V.H., and Schatz, D.G. (2006). Targeting of somatic hypermutation. *Nat Rev Immunol* 6, 573-583.
- Okazaki, I.M., Kinoshita, K., Muramatsu, M., Yoshikawa, K., and Honjo, T. (2002). The AID enzyme induces class switch recombination in fibroblasts. *Nature* 416, 340-345.
- Okazaki, I.M., Kotani, A., and Honjo, T. (2007). Role of AID in tumorigenesis. *Adv Immunol* 94, 245-273.
- Opferman, J.T. (2008). Apoptosis in the development of the immune system. *Cell Death Differ* 15, 234-242.
- Paddison, P.J., Caudy, A.A., Bernstein, E., Hannon, G.J., and Conklin, D.S. (2002). Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. *Genes Dev* 16, 948-958.
- Pajic, A., Spitkovsky, D., Christoph, B., Kempkes, B., Schuhmacher, M., Staeger, M.S., Brielmeier, M., Ellwart, J., Kohlhuber, F., Bornkamm, G.W., *et al.* (2000). Cell cycle activation by c-myc in a burkitt lymphoma model cell line. *Int J Cancer* 87, 787-793.

- Pancer, Z., and Cooper, M.D. (2006). The evolution of adaptive immunity. *Annu Rev Immunol* 24, 497-518.
- Park, S.S., Kim, J.S., Tessarollo, L., Owens, J.D., Peng, L., Han, S.S., Tae Chung, S., Torrey, T.A., Cheung, W.C., Polakiewicz, R.D., *et al.* (2005). Insertion of c-Myc into Igh induces B-cell and plasma-cell neoplasms in mice. *Cancer Res* 65, 1306-1315.
- Pascual, V., Liu, Y.J., Magalski, A., de Bouteiller, O., Banchereau, J., and Capra, J.D. (1994). Analysis of somatic mutation in five B cell subsets of human tonsil. *J Exp Med* 180, 329-339.
- Pasqualucci, L., Bhagat, G., Jankovic, M., Compagno, M., Smith, P., Muramatsu, M., Honjo, T., Morse, H.C., 3rd, Nussenzweig, M.C., and Dalla-Favera, R. (2008). AID is required for germinal center-derived lymphomagenesis. *Nat Genet* 40, 108-112.
- Pasqualucci, L., Migliazza, A., Fracchiolla, N., William, C., Neri, A., Baldini, L., Chaganti, R.S., Klein, U., Kuppers, R., Rajewsky, K., and Dalla-Favera, R. (1998). BCL-6 mutations in normal germinal center B cells: evidence of somatic hypermutation acting outside Ig loci. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 11816-11821.
- Pasqualucci, L., Neumeister, P., Goossens, T., Nanjangud, G., Chaganti, R.S., Kuppers, R., and Dalla-Favera, R. (2001). Hypermutation of multiple proto-oncogenes in B-cell diffuse large-cell lymphomas. *Nature* 412, 341-346.
- Perez-Rosado, A., Artiga, M., Vargiu, P., Sanchez-Aguilera, A., Alvarez-Barrientos, A., and Piris, M. (2008). BCL6 represses NFkappaB activity in diffuse large B-cell lymphomas. *J Pathol* 214, 498-507.
- Peters, A., and Storb, U. (1996). Somatic hypermutation of immunoglobulin genes is linked to transcription initiation. *Immunity* 4, 57-65.
- Petersen-Mahrt, S.K., Harris, R.S., and Neuberger, M.S. (2002). AID mutates *E. coli* suggesting a DNA deamination mechanism for antibody diversification. *Nature* 418, 99-103.
- Pham, P., Bransteitter, R., and Goodman, M.F. (2005). Reward versus risk: DNA cytidine deaminases triggering immunity and disease. *Biochemistry* 44, 2703-2715.
- Phan, R.T., and Dalla-Favera, R. (2004). The BCL6 proto-oncogene suppresses p53 expression in germinal-centre B cells. *Nature* 432, 635-639.
- Phan, R.T., Saito, M., Basso, K., Niu, H., and Dalla-Favera, R. (2005). BCL6 interacts with the transcription factor Miz-1 to suppress the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 and cell cycle arrest in germinal center B cells. *Nat Immunol* 6, 1054-1060.
- Phan, R.T., Saito, M., Kitagawa, Y., Means, A.R., and Dalla-Favera, R. (2007). Genotoxic stress regulates expression of the proto-oncogene Bcl6 in germinal center B cells. *Nat Immunol* 8, 1132-1139.
- Polo, J.M., Dell'Oso, T., Ranuncolo, S.M., Cerchietti, L., Beck, D., Da Silva, G.F., Prive, G.G., Licht, J.D., and Melnick, A. (2004). Specific peptide interference reveals BCL6 transcriptional and oncogenic mechanisms in B-cell lymphoma cells. *Nat Med* 10, 1329-1335.
- Poltoratsky, V., Prasad, R., Horton, J.K., and Wilson, S.H. (2007). Down-regulation of DNA polymerase beta accompanies somatic hypermutation in human BL2 cell lines. *DNA Repair (Amst)* 6, 244-253.

- Portis, T., and Longnecker, R. (2003). Epstein-Barr virus LMP2A interferes with global transcription factor regulation when expressed during B-lymphocyte development. *J Virol* 77, 105-114.
- Prendergast, G.C. (1999). Mechanisms of apoptosis by c-Myc. *Oncogene* 18, 2967-2987.
- Pridans, C., Holmes, M.L., Polli, M., Wettenhall, J.M., Dakic, A., Corcoran, L.M., Smyth, G.K., and Nutt, S.L. (2008). Identification of Pax5 target genes in early B cell differentiation. *J Immunol* 180, 1719-1728.
- Prive, G.G., and Melnick, A. (2006). Specific peptides for the therapeutic targeting of oncogenes. *Curr Opin Genet Dev* 16, 71-77.
- Rabbitts, T.H., Baer, R., Davis, M., Forster, A., Rabbitts, P.H., and Malcolm, S. (1984). c-myc Gene activation and chromosomal translocation. *J Cell Sci Suppl* 1, 95-101.
- Rada, C., Jarvis, J.M., and Milstein, C. (2002b). AID-GFP chimeric protein increases hypermutation of Ig genes with no evidence of nuclear localization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 7003-7008.
- Radtke, F., Wilson, A., Mancini, S.J., and MacDonald, H.R. (2004). Notch regulation of lymphocyte development and function. *Nat Immunol* 5, 247-253.
- Rajewsky, K., Forster, I., and Cumano, A. (1987). Evolutionary and somatic selection of the antibody repertoire in the mouse. *Science* 238, 1088-1094.
- Ramiro, A.R., Jankovic, M., Eisenreich, T., Difilippantonio, S., Chen-Kiang, S., Muramatsu, M., Honjo, T., Nussenzweig, A., and Nussenzweig, M.C. (2004). AID is required for c-myc/IgH chromosome translocations in vivo. *Cell* 118, 431-438.
- Ranuncolo, S.M., Polo, J.M., Dierov, J., Singer, M., Kuo, T., Grealley, J., Green, R., Carroll, M., and Melnick, A. (2007). Bcl-6 mediates the germinal center B cell phenotype and lymphomagenesis through transcriptional repression of the DNA-damage sensor ATR. *Nat Immunol* 8, 705-714.
- Revy, P., Muto, T., Levy, Y., Geissmann, F., Plebani, A., Sanal, O., Catalan, N., Forveille, M., Dufourcq-Labeuise, R., Gennery, A., *et al.* (2000). Activation-induced cytidine deaminase (AID) deficiency causes the autosomal recessive form of the Hyper-IgM syndrome (HIGM2). *Cell* 102, 565-575.
- Reynolds, A., Anderson, E.M., Vermeulen, A., Fedorov, Y., Robinson, K., Leake, D., Karpilow, J., Marshall, W.S., and Khvorova, A. (2006). Induction of the interferon response by siRNA is cell type- and duplex length-dependent. *RNA* 12, 988-993.
- Rickinson, A. (2002). Epstein-Barr virus. *Virus Res* 82, 109-113.
- Rogozin, I.B., and Kolchanov, N.A. (1992). Somatic hypermutagenesis in immunoglobulin genes. II. Influence of neighbouring base sequences on mutagenesis. *Biochim Biophys Acta* 1171, 11-18.
- Rolink, A.G., Nutt, S.L., Melchers, F., and Busslinger, M. (1999). Long-term in vivo reconstitution of T-cell development by Pax5-deficient B-cell progenitors. *Nature* 401, 603-606.

- Rolink, A.G., Schaniel, C., Busslinger, M., Nutt, S.L., and Melchers, F. (2000). Fidelity and infidelity in commitment to B-lymphocyte lineage development. *Immunol Rev* 175, 104-111.
- Ross, A.L., and Sale, J.E. (2006). The catalytic activity of REV1 is employed during immunoglobulin gene diversification in DT40. *Mol Immunol* 43, 1587-1594.
- Rucci, F., Cattaneo, L., Marrella, V., Sacco, M.G., Sobacchi, C., Lucchini, F., Nicola, S., Della Bella, S., Villa, M.L., Imberti, L., *et al.* (2006). Tissue-specific sensitivity to AID expression in transgenic mouse models. *Gene* 377, 150-158.
- Rückerl, F., and Bachl, J. (2005). Activation-induced cytidine deaminase fails to induce a mutator phenotype in the human pre-B cell line Nalm-6. *Eur J Immunol* 35, 290-298.
- Rückerl, F., Busse, B., and Bachl, J. (2006). Episomal vectors to monitor and induce somatic hypermutation in human Burkitt-Lymphoma cell lines. *Mol Immunol* 43, 1645-1652.
- Rückerl, F., Mailhammer, R., and Bachl, J. (2004). Dual reporter system to dissect cis- and trans-effects influencing the mutation rate in a hypermutating cell line. *Mol Immunol* 41, 1135-1143.
- Rutherford, M.N., and LeBrun, D.P. (1998). Restricted expression of E2A protein in primary human tissues correlates with proliferation and differentiation. *Am J Pathol* 153, 165-173.
- Saito, M., Gao, J., Basso, K., Kitagawa, Y., Smith, P.M., Bhagat, G., Pernis, A., Pasqualucci, L., and Dalla-Favera, R. (2007). A signaling pathway mediating downregulation of BCL6 in germinal center B cells is blocked by BCL6 gene alterations in B cell lymphoma. *Cancer Cell* 12, 280-292.
- Sale, J.E., Calandrini, D.M., Takata, M., Takeda, S., and Neuberger, M.S. (2001). Ablation of XRCC2/3 transforms immunoglobulin V gene conversion into somatic hypermutation. *Nature* 412, 921-926.
- Sale, J.E., and Neuberger, M.S. (1998). TdT-accessible breaks are scattered over the immunoglobulin V domain in a constitutively hypermutating B cell line. *Immunity* 9, 859-869.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Manatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual.
- Sampson, V.B., Rong, N.H., Han, J., Yang, Q., Aris, V., Soteropoulos, P., Petrelli, N.J., Dunn, S.P., and Krueger, L.J. (2007). MicroRNA let-7a down-regulates MYC and reverts MYC-induced growth in Burkitt lymphoma cells. *Cancer Res* 67, 9762-9770.
- Sayegh, C.E., Quong, M.W., Agata, Y., and Murre, C. (2003). E-proteins directly regulate expression of activation-induced deaminase in mature B cells. *Nat Immunol* 4, 586-593.
- Schebesta, A., McManus, S., Salvagiotto, G., Delogu, A., Busslinger, G.A., and Busslinger, M. (2007). Transcription factor Pax5 activates the chromatin of key genes involved in B cell signaling, adhesion, migration, and immune function. *Immunity* 27, 49-63.
- Schebesta, M., Heavey, B., and Busslinger, M. (2002). Transcriptional control of B-cell development. *Curr Opin Immunol* 14, 216-223.
- Schlee, M., Holzel, M., Bernard, S., Mailhammer, R., Schuhmacher, M., Reschke, J., Eick, D., Marinkovic, D., Wirth, T., Rosenwald, A., *et al.* (2007). C-myc activation impairs the NF-

kappaB and the interferon response: implications for the pathogenesis of Burkitt's lymphoma. *Int J Cancer* 120, 1387-1395.

Schlosser, I., Holzel, M., Hoffmann, R., Burtscher, H., Kohlhuber, F., Schuhmacher, M., Chapman, R., Weidle, U.H., and Eick, D. (2005). Dissection of transcriptional programmes in response to serum and c-Myc in a human B-cell line. *Oncogene* 24, 520-524.

Schlosser, I., Holzel, M., Murnseer, M., Burtscher, H., Weidle, U.H., and Eick, D. (2003). A role for c-Myc in the regulation of ribosomal RNA processing. *Nucleic Acids Res* 31, 6148-6156.

Schoetz, U., Cervelli, M., Wang, Y.D., Fiedler, P., and Buerstedde, J.M. (2006). E2A expression stimulates Ig hypermutation. *J Immunol* 177, 395-400.

Schuhmacher, M., Kohlhuber, F., Holzel, M., Kaiser, C., Burtscher, H., Jarsch, M., Bornkamm, G.W., Laux, G., Polack, A., Weidle, U.H., and Eick, D. (2001). The transcriptional program of a human B cell line in response to Myc. *Nucleic Acids Res* 29, 397-406.

Schuhmacher, M., Staeger, M.S., Pajic, A., Polack, A., Weidle, U.H., Bornkamm, G.W., Eick, D., and Kohlhuber, F. (1999). Control of cell growth by c-Myc in the absence of cell division. *Curr Biol* 9, 1255-1258.

Schwickert, T.A., Lindquist, R.L., Shakhar, G., Livshits, G., Skokos, D., Kosco-Vilbois, M.H., Dustin, M.L., and Nussenzweig, M.C. (2007). In vivo imaging of germinal centres reveals a dynamic open structure. *Nature* 446, 83-87.

Sears, R.C. (2004). The life cycle of C-myc: from synthesis to degradation. *Cell Cycle* 3, 1133-1137.

Sen, R. (2006). Control of B lymphocyte apoptosis by the transcription factor NF-kappaB. *Immunity* 25, 871-883.

Shaffer, A.L., Lin, K.I., Kuo, T.C., Yu, X., Hurt, E.M., Rosenwald, A., Giltane, J.M., Yang, L., Zhao, H., Calame, K., and Staudt, L.M. (2002a). Blimp-1 orchestrates plasma cell differentiation by extinguishing the mature B cell gene expression program. *Immunity* 17, 51-62.

Shaffer, A.L., Rosenwald, A., Hurt, E.M., Giltane, J.M., Lam, L.T., Pickeral, O.K., and Staudt, L.M. (2001). Signatures of the immune response. *Immunity* 15, 375-385.

Shaffer, A.L., Rosenwald, A., and Staudt, L.M. (2002b). Lymphoid malignancies: the dark side of B-cell differentiation. *Nat Rev Immunol* 2, 920-932.

Shen, H.M., Michael, N., Kim, N., and Storb, U. (2000). The TATA binding protein, c-Myc and survivin genes are not somatically hypermutated, while Ig and BCL6 genes are hypermutated in human memory B cells. *Int Immunol* 12, 1085-1093.

Shen, H.M., Peters, A., Baron, B., Zhu, X., and Storb, U. (1998). Mutation of BCL-6 gene in normal B cells by the process of somatic hypermutation of Ig genes. *Science* 280, 1750-1752.

Siemer, D., Kurth, J., Lang, S., Lehnerdt, G., Stanelle, J., and Kuppers, R. (2008). EBV transformation overrides gene expression patterns of B cell differentiation stages. *Mol Immunol* 45, 3133-3141.

- Singh, M., and Birshstein, B.K. (1993). NF-HB (BSAP) is a repressor of the murine immunoglobulin heavy-chain 3' alpha enhancer at early stages of B-cell differentiation. *Mol Cell Biol* 13, 3611-3622.
- Smith, E., and Sigvardsson, M. (2004). The roles of transcription factors in B lymphocyte commitment, development, and transformation. *J Leukoc Biol* 75, 973-981.
- Smith, S.H., and Reth, M. (2004). Perspectives on the nature of BCR-mediated survival signals. *Mol Cell* 14, 696-697.
- Souabni, A., Cobaleda, C., Schebesta, M., and Busslinger, M. (2002). Pax5 promotes B lymphopoiesis and blocks T cell development by repressing Notch1. *Immunity* 17, 781-793.
- Staudt, L.M., and Lenardo, M.J. (1991). Immunoglobulin gene transcription. *Annu Rev Immunol* 9, 373-398.
- Storb, U., Peters, A., Klotz, E., Kim, N., Shen, H.M., Hackett, J., Rogerson, B., and Martin, T.E. (1998). Cis-acting sequences that affect somatic hypermutation of Ig genes. *Immunol Rev* 162, 153-160.
- Swanberg, S.E., Payne, W.S., Hunt, H.D., Dodgson, J.B., and Delany, M.E. (2004). Telomerase activity and differential expression of telomerase genes and c-myc in chicken cells in vitro. *Dev Dyn* 231, 14-21.
- Thai, T.H., Calado, D.P., Casola, S., Ansel, K.M., Xiao, C., Xue, Y., Murphy, A., Frendewey, D., Valenzuela, D., Kutok, J.L., *et al.* (2007). Regulation of the germinal center response by microRNA-155. *Science* 316, 604-608.
- Thorley-Lawson, D.A. (2001). Epstein-Barr virus: exploiting the immune system. *Nat Rev Immunol* 1, 75-82.
- Tobollik, S., Meyer, L., Buettner, M., Klemmer, S., Kempkes, B., Kremmer, E., Niedobitek, G., and Jungnickel, B. (2006). Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 inhibits AID expression during EBV-driven B-cell growth. *Blood* 108, 3859-3864.
- Toyama, H., Okada, S., Hatano, M., Takahashi, Y., Takeda, N., Ichii, H., Takemori, T., Kuroda, Y., and Tokuhiya, T. (2002). Memory B cells without somatic hypermutation are generated from Bcl6-deficient B cells. *Immunity* 17, 329-339.
- Tunayaplin, C., Shaffer, A.L., Angelin-Duclos, C.D., Yu, X., Staudt, L.M., and Calame, K.L. (2004). Direct repression of prdm1 by Bcl-6 inhibits plasmacytic differentiation. *J Immunol* 173, 1158-1165.
- Uchida, J., Yasui, T., Takaoka-Shichijo, Y., Muraoka, M., Kulwichit, W., Raab-Traub, N., and Kikutani, H. (1999). Mimicry of CD40 signals by Epstein-Barr virus LMP1 in B lymphocyte responses. *Science* 286, 300-303.
- Unniraman, S., Zhou, S., and Schatz, D.G. (2004). Identification of an AID-independent pathway for chromosomal translocations between the Igh switch region and Myc. *Nat Immunol* 5, 1117-1123.
- Urbanek, P., Wang, Z.Q., Fetka, I., Wagner, E.F., and Busslinger, M. (1994). Complete block of early B cell differentiation and altered patterning of the posterior midbrain in mice lacking Pax5/BSAP. *Cell* 79, 901-912.

- Vigorito, E., Perks, K.L., Abreu-Goodger, C., Bunting, S., Xiang, Z., Kohlhaas, S., Das, P.P., Miska, E.A., Rodriguez, A., Bradley, A., *et al.* (2007). microRNA-155 regulates the generation of immunoglobulin class-switched plasma cells. *Immunity* 27, 847-859.
- Vitola, S.J., Wang, A., and Sun, X.H. (1996). Substitution of basic amino acids in the basic region stabilizes DNA binding by E12 homodimers. *Nucleic Acids Res* 24, 1921-1927.
- Vora, K.A., Lentz, V.M., Monsell, W., Rao, S.P., Mettus, R., Toscani, A., Reddy, E.P., and Manser, T. (2001). The T cell-dependent B cell immune response and germinal center reaction are intact in A-myb-deficient mice. *J Immunol* 166, 3226-3230.
- Wang, C.L., and Wabl, M. (2005). Hypermutation rate normalized by chronological time. *J Immunol* 174, 5650-5654.
- Wang, H., Hammoudeh, D.I., Follis, A.V., Reese, B.E., Lazo, J.S., Metallo, S.J., and Prochownik, E.V. (2007). Improved low molecular weight Myc-Max inhibitors. *Mol Cancer Ther* 6, 2399-2408.
- Wang, X., Li, Z., Naganuma, A., and Ye, B.H. (2002). Negative autoregulation of BCL-6 is bypassed by genetic alterations in diffuse large B cell lymphomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 15018-15023.
- Wang, Y.H., Liu, S., Zhang, G., Zhou, C.Q., Zhu, H.X., Zhou, X.B., Quan, L.P., Bai, J.F., and Xu, N.Z. (2005). Knockdown of c-Myc expression by RNAi inhibits MCF-7 breast tumor cells growth in vitro and in vivo. *Breast Cancer Res* 7, R220-228.
- Weinstein, P.D., and Cebra, J.J. (1991). The preference for switching to IgA expression by Peyer's patch germinal center B cells is likely due to the intrinsic influence of their microenvironment. *J Immunol* 147, 4126-4135.
- Welner, R.S., Pelayo, R., and Kincade, P.W. (2008). Evolving views on the genealogy of B cells. *Nat Rev Immunol* 8, 95-106.
- Wiens, M., Korzhev, M., Perovic-Ottstadt, S., Luthringer, B., Brandt, D., Klein, S., and Muller, W.E. (2007). Toll-like receptors are part of the innate immune defense system of sponges (demospongiae: Porifera). *Mol Biol Evol* 24, 792-804.
- Wilson, P.C., de Bouteiller, O., Liu, Y.J., Potter, K., Banchereau, J., Capra, J.D., and Pascual, V. (1998). Somatic hypermutation introduces insertions and deletions into immunoglobulin V genes. *J Exp Med* 187, 59-70.
- Withers, D.R., Davison, T.F., and Young, J.R. (2005). Developmentally programmed expression of AID in chicken B cells. *Dev Comp Immunol* 29, 651-662.
- Woo, C.J., Martin, A., and Scharff, M.D. (2003). Induction of somatic hypermutation is associated with modifications in immunoglobulin variable region chromatin. *Immunity* 19, 479-489.
- Yadav, A., Oлару, A., Saltis, M., Setren, A., Cerny, J., and Livak, F. (2006). Identification of a ubiquitously active promoter of the murine activation-induced cytidine deaminase (AICDA) gene. *Mol Immunol* 43, 529-541.

- Yan, W., Young, A.Z., Soares, V.C., Kelley, R., Benezra, R., and Zhuang, Y. (1997). High incidence of T-cell tumors in E2A-null mice and E2A/Id1 double-knockout mice. *Mol Cell Biol* 17, 7317-7327.
- Yan, Y., Park, S.S., Janz, S., and Eckhardt, L.A. (2007). In a model of immunoglobulin heavy-chain (IGH)/MYC translocation, the Igh 3' regulatory region induces MYC expression at the immature stage of B cell development. *Genes Chromosomes Cancer* 46, 950-959.
- Yang, S.Y., Fugmann, S.D., and Schatz, D.G. (2006). Control of gene conversion and somatic hypermutation by immunoglobulin promoter and enhancer sequences. *J Exp Med* 203, 2919-2928.
- Ye, B.H., Lista, F., Lo Coco, F., Knowles, D.M., Offit, K., Chaganti, R.S., and Dalla-Favera, R. (1993). Alterations of a zinc finger-encoding gene, BCL-6, in diffuse large-cell lymphoma. *Science* 262, 747-750.
- Yelamos, J., Klix, N., Goyenechea, B., Lozano, F., Chui, Y.L., Gonzalez Fernandez, A., Pannell, R., Neuberger, M.S., and Milstein, C. (1995). Targeting of non-Ig sequences in place of the V segment by somatic hypermutation. *Nature* 376, 225-229.
- Yin, X., Giap, C., Lazo, J.S., and Prochownik, E.V. (2003). Low molecular weight inhibitors of Myc-Max interaction and function. *Oncogene* 22, 6151-6159.
- Yoshikawa, K., Okazaki, I.M., Eto, T., Kinoshita, K., Muramatsu, M., Nagaoka, H., and Honjo, T. (2002). AID enzyme-induced hypermutation in an actively transcribed gene in fibroblasts. *Science* 296, 2033-2036.
- Young, L.S., and Rickinson, A.B. (2004). Epstein-Barr virus: 40 years on. *Nat Rev Cancer* 4, 757-768.
- Zan, H., Komori, A., Li, Z., Cerutti, A., Schaffer, A., Flajnik, M.F., Diaz, M., and Casali, P. (2001). The translesion DNA polymerase zeta plays a major role in Ig and bcl-6 somatic hypermutation. *Immunity* 14, 643-653.
- Zhang, W., Bardwell, P.D., Woo, C.J., Poltoratsky, V., Scharff, M.D., and Martin, A. (2001). Clonal instability of V region hypermutation in the Ramos Burkitt's lymphoma cell line. *Int Immunol* 13, 1175-1184.
- Zhong, C.H., Prima, V., Liang, X., Frye, C., McGavran, L., Meltesen, L., Wei, Q., Boomer, T., Varella-Garcia, M., Gump, J., and Hunger, S.P. (2008). E2A-ZNF384 and NOL1-E2A fusion created by a cryptic t(12;19)(p13.3; p13.3) in acute leukemia. *Leukemia* 22, 723-729.
- Zhou, C., Saxon, A., and Zhang, K. (2003). Human activation-induced cytidine deaminase is induced by IL-4 and negatively regulated by CD45: implication of CD45 as a Janus kinase phosphatase in antibody diversification. *J Immunol* 170, 1887-1893.
- Zhuang, Y., Soriano, P., and Weintraub, H. (1994). The helix-loop-helix gene E2A is required for B cell formation. *Cell* 79, 875-884.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen für die Hilfe und Unterstützung bedanken, die mir geholfen hat, diese Doktorarbeit durchzustehen und erfolgreich abzuschließen.

Ich danke Dr. Berit Jungnickel für ihren Glauben an meine Fähigkeiten und ihre Unterstützung sowohl in guten als auch in weniger guten Phasen dieser Arbeit.

Prof. Dr. Dirk Eick danke ich für seine offene und gleichzeitig konstruktiv-kritische Betreuung meiner Doktorarbeit.

Meiner Arbeitsgruppe und zeitweise Ersatzfamilie danke ich für das angenehme Arbeitsklima, gemeinsamen Speis und Trank zur physischen Unterstützung sowie die Zusammenarbeit und fachliche Diskussion.

Ich bedanke mich bei den vielen fleißigen Händen ohne deren Mithilfe diese Arbeit nicht denkbar gewesen wäre: allen voran André der Liebe, Sandra und in der letzten Phase der Arbeit Jutta.

Auch außerhalb der Arbeitsgruppe gab es viele liebe Kollegen die mit allem von guten, manchmal auch „interessantem“ Essen im Lunch Club, über fachliche Unterstützung (Blotlehrgang bei Judith, Northern mit Thomas, Lightcycler von Hella) bis zu schönen Momenten abseits des Institut einen wichtigen Beitrag für das Wohlbefinden am Arbeitsplatz geleistet haben.

Ich freue mich besonders über die Freundschaften, die aus der gemeinsamen Arbeit entstanden sind: Maren meine persönlichen Heldin, Stephi für Einblicke ins Familienleben und besonders meinem Laborehepartner Isha. Die gemeinsamen Urlaube, Flahzabende und Snackpausen waren willkommene Unterbrechungen der gemeinsamen Laborzeit.

Die letzten Jahren waren in beruflicher wie in persönlicher Hinsicht eine große Herausforderung und meine Familie hat mich in deren Bewältigung immer unterstützt und gefördert. Vorallem Micha danke ich für seine Bereitschaft in kritischen Situationen mit Internet-Recherchen, Telefonseelsorge oder unverbindlichen juristischen Ratschlägen zu helfen.

Last but not least I have to thank Tony for finding me and not being put off by starting a relationship with someone in the middle of a very demanding thesis project. His love changed my life and gives it a perspective far beyond science.

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich versichere hiermit ehrenwörtlich, dass die Dissertation von mir selbstständig, ohne unerlaubte Beihilfe angefertigt worden ist.

München, den 30. Oktober 2008

Hanna Scheller

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich mich nicht anderweitig einer Doktorprüfung ohne Erfolg unterzogen habe.

München, den 30. Oktober 2008

Hanna Scheller

Lebenslauf

Hanna Scheller

geboren in Bremen am 16.09.1977

Staatsangehörigkeit Deutsch

Schulischer Bildungsweg

1984 – 1988 Grundschule an der Freiligrathstraße, Bremen

1988 – 1990 Orientierungsstufe des Schulzentrums (SZ) an der Julius-Brecht Allee, Bremen

1990 – 1994 Gymnasium des SZ an der Julius-Brecht Allee, Bremen

1994 – 1997 gymnasiale Oberstufe des SZ Horn am Vorkampsweg, Bremen

1997 Abitur

Wissenschaftlicher Werdegang

1997-2003 Biologiestudium an der Georg-August Universität, Göttingen

2000 Auslandssemester an der Universität Groningen, Niederlande

2003 Diplomarbeit am Anthropologischen Institut der Universität Göttingen zum Thema „Molekulargenetischer Nachweis von Krankheitserregern aus Skeletten eines mittelalterlichen Pestmassengrabes“

2004 Doktorand am Max-von-Pettenkofer Institut, München, im Graduiertenkolleg „Infection and Immunity“

seit 2005 Doktorand am Helmholtz Zentrum München, Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt in der Abteilung „Klinische Molekularbiologie“ zum Thema „Modulation der somatischen Hypermutation durch Transkriptionsfaktoren“